

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP2006/303569

International filing date: 27 February 2006 (27.02.2006)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2005-057253  
Filing date: 02 March 2005 (02.03.2005)

Date of receipt at the International Bureau: 27 April 2006 (27.04.2006)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2005年 3月 2日

出 願 番 号  
Application Number: 特願2005-057253

パリ条約による外国への出願  
に用いる優先権の主張の基礎  
となる出願の国コードと出願  
番号

J P 2005-057253

The country code and number  
of your priority application,  
to be used for filing abroad  
under the Paris Convention, is

出 願 人  
Applicant(s): 松下電器産業株式会社

2006年 4月12日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

中 嶋



【書類名】 特許願  
【整理番号】 3162361148  
【提出日】 平成17年 3月 2日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 G01N 1/28  
【発明者】  
    【住所又は居所】 大阪府門真市松葉町 2 番 7 号 パナソニックファクトリーソリュー  
                        ーションズ株式会社内  
    【氏名】 松▲崎▼ 浩文  
【特許出願人】  
    【識別番号】 000005821  
    【氏名又は名称】 松下電器産業株式会社  
【代理人】  
    【識別番号】 100097445  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 岩橋 文雄  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100103355  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 坂口 智康  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100109667  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 内藤 浩樹  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 011305  
    【納付金額】 16,000円  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 特許請求の範囲 1  
    【物件名】 明細書 1  
    【物件名】 図面 1  
    【物件名】 要約書 1  
    【包括委任状番号】 9809938

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

結晶化容器に保持された蛋白質溶液中の蛋白質結晶を検出する蛋白質結晶検出装置であって、

観察対象の結晶化容器がセットされる観察ステージと、前記観察ステージにおいて前記蛋白質溶液を合焦方向の位置が異なる複数の断面毎に撮像して複数のレイヤー画像を取り込むカメラと、前記カメラによって取り込まれた前記複数のレイヤー画像を記憶する観察画像記憶部と、前記観察画像記憶部に記憶された各レイヤー画像から蛋白質結晶の特徴部分を抽出した結晶特徴画像を各レイヤー画像毎に生成する結晶特徴画像生成部と、前記結晶特徴画像に含まれる蛋白質結晶の特徴部分を数値化したレイヤー情報を各レイヤー画像毎に求めるレイヤー情報抽出部と、各レイヤー画像単独の前記レイヤー情報および隣接する前記断面のレイヤー画像間における前記レイヤー情報の相対関係に基づいて、前記蛋白質溶液中の蛋白質結晶の生成状況を判定する結晶化判定部とを備えたことを特徴とする蛋白質結晶検出装置。

【請求項 2】

前記結晶特徴画像は蛋白質結晶の特徴部分を抽出した二値化画像であり、前記レイヤー情報は、少なくとも前記二値化画像において蛋白質結晶の特徴部分に該当する画素の数とこれらの画素のかたまりであるラベルの数とを含むことを特徴とする請求項 1 記載の蛋白質結晶検出装置。

【請求項 3】

前記結晶化判定部は、蛋白質結晶と蛋白質結晶以外の生成物の有無を判定することを特徴とする請求項 1 または 2 記載の蛋白質結晶検出装置。

【請求項 4】

結晶化容器に保持された蛋白質溶液中の蛋白質結晶を検出する蛋白質結晶検出方法であって、

観察対象の結晶化容器がセットされる観察ステージにおいて前記蛋白質溶液を合焦方向の位置が異なる複数の断面毎に撮像して複数のレイヤー画像を取り込む画像取込工程と、取り込まれた前記複数のレイヤー画像を記憶する画像記憶工程と、前記各レイヤー画像から蛋白質結晶の特徴部分を抽出した結晶特徴画像をレイヤー画像毎に生成する結晶特徴画像生成工程と、前記結晶特徴画像に含まれる蛋白質結晶の特徴部分を数値化したレイヤー情報を各レイヤー画像毎に求めるレイヤー情報抽出工程と、各レイヤー画像単独の前記レイヤー情報および隣接する前記断面のレイヤー画像間における前記レイヤー情報の相対関係に基づいて、前記蛋白質溶液中の蛋白質結晶の生成状況を判定する結晶化判定工程とを含むことを特徴とする蛋白質結晶検出方法。

【請求項 5】

前記結晶特徴画像生成工程において、蛋白質結晶の特徴部分を抽出した二値化画像を生成し、前記レイヤー情報が、少なくとも前記二値化画像において蛋白質結晶の特徴部分に該当する画素の数とこれらの画素のかたまりであるラベルの数とを含むことを特徴とする請求項 4 記載の蛋白質結晶検出方法。

【請求項 6】

前記結晶化判定工程において、蛋白質結晶と蛋白質結晶以外の生成物の有無を判定することを特徴とする請求項 4 または 5 記載の蛋白質結晶検出方法。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 蛋白質結晶検出装置および蛋白質結晶検出方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、結晶化容器に保持された蛋白質溶液中の蛋白質結晶を検出する蛋白質結晶検出装置および蛋白質結晶検出方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

近年遺伝子情報を医療などの分野に有効に利用するための取り組みが活発化しており、その基礎技術として遺伝子を構成する蛋白質の構造を解析する努力が行われている。この蛋白質の構造解析は、蛋白質を構成するアミノ酸が3次元の線状に連なった立体構造を特定するものであり、X線結晶構造解析などの方法によって行われる。

【0003】

このような蛋白質の構造解析を行うためには、まず解析対象の蛋白質を結晶化することが求められ、この蛋白質結晶化の方法として蒸気拡散法が知られている。この方法では、結晶化対象の蛋白質を含む蛋白質溶液から蒸発する溶媒成分を同一容器内に収容された結晶化溶液によって吸収させることにより、蛋白質溶液を過飽和状態に保って結晶を徐々に生成させる。

【0004】

結晶化を促進させるための結晶生育条件は現状では理論的に解明されていないため、各種の条件を変えながら多数の試験を系統的に実行した結果から最良の条件を求めるスクリーニングの手法が用いられ、従来より対象となる蛋白質溶液を各種の結晶生育条件、すなわち前述の結晶化溶液の種類・濃度や生育温度を変化させた幾通りもの条件下で、試験を反復実行する必要があった。

【0005】

このような試験は、蛋白質溶液および結晶化溶液を収容した結晶化用マイクロプレートなどの結晶化容器を特定温度に設定された恒温室内に保管し、結晶化の有無や進行度合いを時間経過に伴って観察することによって行われる。この蛋白質結晶検出を目的とした観察作業を効率よく行うため、試験担当者が顕微鏡視野内で蛋白質溶液を目視観察することによって結晶化の進行状況をデータ化し記録する作業を画像認識によって行う蛋白質結晶検出装置が提案されている（例えば特許文献1参照）。この蛋白質結晶検出装置においては、観察対象の蛋白質溶液をカメラで撮像した画像を認識処理することにより、蛋白質結晶の特徴部分を検出するようにしている。

【特許文献1】 特開2004-323336号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

しかしながら、上述の特許文献例に示す技術においては、溶液中の蛋白質結晶を精度良く検出する上で、次のような課題があった。すなわち蒸気拡散法による結晶生成過程においては、蛋白質溶液中には結晶化に至らなかった沈殿物などの固形異物が蛋白質結晶とともに存在する。ところが、上述の蛋白質結晶観察装置では、検出対象の蛋白質結晶と結晶には至らないまま固化した沈殿物などの非結晶生成物を画像上で明確に識別することが困難で、蛋白質結晶の検出精度を低下させることとなっていた。

【0007】

そこで本発明は、蛋白質結晶を高い精度で検出できる蛋白質結晶検出装置および蛋白質結晶検出方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明の蛋白質結晶検出装置は、結晶化容器に保持された蛋白質溶液中の蛋白質結晶を検出する蛋白質結晶検出装置であって、観察対象の結晶化容器がセットされる観察ステー



ジと、前記観察ステージにおいて前記蛋白質溶液を合焦方向の位置が異なる複数の断面毎に撮像して複数のレイヤー画像を取り込むカメラと、前記カメラによって取り込まれた前記複数のレイヤー画像を記憶する観察画像記憶部と、前記観察画像記憶部に記憶された各レイヤー画像から蛋白質結晶の特徴部分を抽出した結晶特徴画像を各レイヤー画像毎に生成する結晶特徴画像生成部と、前記結晶特徴画像に含まれる蛋白質結晶の特徴部分を数値化したレイヤー情報を各レイヤー画像毎に求めるレイヤー情報抽出部と、各レイヤー画像単独の前記レイヤー情報および隣接する前記断面のレイヤー画像間における前記レイヤー情報の相対関係に基づいて、前記蛋白質溶液中の蛋白質結晶の生成状況を判定する結晶化判定部とを備えた。

#### 【0009】

本発明の蛋白質結晶検出方法は、結晶化容器に保持された蛋白質溶液中の蛋白質結晶を検出する蛋白質結晶検出方法であって、観察対象の結晶化容器がセットされる観察ステージにおいて前記蛋白質溶液を合焦方向の位置が異なる複数の断面毎に撮像して複数のレイヤー画像を取り込む画像取込工程と、取り込まれた前記複数のレイヤー画像を記憶する画像記憶工程と、前記各レイヤー画像から蛋白質結晶の特徴部分を抽出した結晶特徴画像をレイヤー画像毎に生成する結晶特徴画像生成工程と、前記結晶特徴画像に含まれる蛋白質結晶の特徴部分を数値化したレイヤー情報を各レイヤー画像毎に求めるレイヤー情報抽出工程と、各レイヤー画像単独の前記レイヤー情報および隣接する前記断面のレイヤー画像間における前記レイヤー情報の相対関係に基づいて、前記蛋白質溶液中の蛋白質結晶の生成状況を判定する結晶化判定工程とを含む。

#### 【発明の効果】

#### 【0010】

本発明によれば、蛋白質溶液を複数の断面で撮像して取り込まれた各レイヤー画像から生成した結晶特徴画像に含まれる蛋白質結晶の特徴部分を数値化したレイヤー情報を各レイヤー画像毎に求め、各レイヤー画像単独のレイヤー情報および隣接する断面のレイヤー画像間におけるレイヤー情報の相対関係に基づいて蛋白質結晶の生成状況を判定することにより、蛋白質結晶とその他の生成物とを精度良く識別して、蛋白質結晶を高い精度で検出することができる。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0011】

次に本発明の実施の形態を図面を参照して説明する。図1は本発明の一実施の形態の蛋白質結晶検出装置の斜視図、図2は本発明の一実施の形態の蛋白質結晶検出装置の透視斜視図、図3は本発明の一実施の形態の蛋白質結晶検出装置の断面図、図4は本発明の一実施の形態の蛋白質結晶検出装置に使用される結晶化プレートの斜視図、図5、図7は本発明の一実施の形態の蛋白質結晶検出装置に使用される結晶化プレートの部分断面図、図6(a)は本発明の一実施の形態の蛋白質結晶検出装置の観察部の部分断面図、図6(b)は本発明の一実施の形態の蛋白質結晶検出装置に使用される結晶化プレートの拡大部分断面図、図8は本発明の一実施の形態の蛋白質結晶検出装置の制御系の構成を示すブロック図、図9は本発明の一実施の形態の蛋白質結晶検出装置の蛋白質結晶検出処理機能を示す機能ブロック図、図10は本発明の一実施の形態の蛋白質結晶検出装置における観察動作のフロー図、図11は本発明の一実施の形態の蛋白質結晶検出方法を示すフロー図、図12は本発明の一実施の形態の蛋白質結晶検出方法における結晶化判定処理を示すフロー図、図13は本発明の一実施の形態の蛋白質結晶検出装置に使用される結晶化プレートの部分断面図、図14は本発明の一実施の形態の蛋白質結晶検出方法におけるレイヤー画像を示す図、図15は本発明の一実施の形態の蛋白質結晶検出方法におけるレイヤー微分画像を示す図、図16は本発明の一実施の形態の蛋白質結晶検出方法におけるレイヤー微分画像(マスク処理)を示す図、図17は本発明の一実施の形態の蛋白質結晶検出方法におけるレイヤー細線化画像を示す図、図18は本発明の一実施の形態の蛋白質結晶検出方法におけるレイヤー微分画像(ノイズ除去)を示す図、図19、図20、図21は本発明の一実施の形態の蛋白質結晶検出方法におけるレイヤー二値化画像を示す図である。

#### 【0012】

まず図1、図2、図3を参照して、蛋白質結晶検出装置の全体構造を説明する。蛋白質結晶検出装置1は、蒸気拡散法により蛋白質溶液内で生成した蛋白質結晶を検出するために使用される専用の検出装置である。

#### 【0013】

図1、図2において、蛋白質結晶検出装置1は、箱形状の恒温室2内にストレージ部5、搬送ユニット7および観察部9を配置した構成となっている。恒温室2は内部雰囲気を設定温度に保持する温調機能を備えており、図1に示すように、恒温室2の前面には、内部アクセス用の扉3a、前面からの操作・点検用の小扉3bおよび内部点検用の窓2b、表示パネルと操作・入力部とが一体となったいわゆるタッチパネル型の制御パネル4が配設されている。そして、恒温室2の側面には観察対象を内部へ搬入するための搬入口2aが設けられている。搬入口2aは、搬入口開閉機構（図示省略）によって開閉自在となっている。

#### 【0014】

次に図2、図3を参照して、恒温室2の内部構造を説明する。恒温室2の内部には、奥側壁面に沿って縦型棚形状のストレージ部5が配置されている。ストレージ部5は棚状に仕切られた複数の収納部5aを備えており、収納部5aには結晶化用のマイクロプレート6（以下、単に「結晶化プレート6」と略記する）が1つだけ収納される。結晶化プレート6は、蛋白質溶液中の蛋白質を結晶化させるために用いられる結晶化容器である。

#### 【0015】

ストレージ部5の前面には搬送ユニット7が配置されている。搬送ユニット7は、Xテーブル7X、Yテーブル7Y、Zテーブル7Z、回転ヘッド7R、プレート保持ヘッド8を備えている。Xテーブル7Xは、床面に水平姿勢でX方向（ストレージ部5に平行な方向）に配設されており、Xテーブル7Xに立設されたZテーブル7Zには、Yテーブル7Yが水平姿勢で装着されている。Yテーブル7Yには回転ヘッド7Rが装着されており、回転ヘッド7Rの回転軸にはプレート保持ヘッド8が装着されている。Xテーブル7X、Yテーブル7Y、Zテーブル7Zを駆動することにより、プレート保持ヘッド8はストレージ部5の前面でX、Y、Z方向に移動する。また、回転ヘッド7Rを駆動することにより、保持ヘッド8の水平方向の向きを変更することができる。

#### 【0016】

そしてこのXYZ方向の移動により、プレート保持ヘッド8は搬入口2aから搬入される結晶化プレート6をアーム8aによって挟んで保持し、ストレージ部5の指定された収納部5aに収納する。収納部5aで所定時間保持された結晶化プレート6は、プレート保持ヘッド8によって保持され、観察部9まで搬送される。搬送ユニット7は、結晶化プレート6をストレージ部5と観察ステージ9bとの間で搬送する搬送手段となっている。

#### 【0017】

観察部9は基台9a上に立設されたフレーム9cに、観察ステージ9bを水平姿勢で装着し、観察ステージ9bの上方にカメラ10を配置した構成となっている。観察ステージ9bにはプレート保持ヘッド8によって搬送された結晶化プレート6が載置され、セットされる。観察ステージ9bに備えられたXYZ移動機構を駆動することにより、結晶化プレート6はX、Y、Z方向に移動する。そしてカメラ10は、観察ステージ9bにセットされた結晶化プレート6の蛋白質溶液を観察して画像データに取り込む。

#### 【0018】

図4、図5を参照して、結晶化プレート6について説明する。図4に示すように、結晶化プレート6には複数のウェル6aが格子状に形成されている。ウェル6aは、円形の凹部の中心に円柱状の液保持部6bが設けられたいわゆるカルデラ状の液体収納用の凹部であり、ウェル6a内には、結晶化の対象となる試料、すなわち結晶化対象の蛋白質を含んだ蛋白質溶液13と、結晶化に用いられる結晶化溶液12とが分注される。

#### 【0019】

図5はこれらの試料を収容した1つのウェル6aの断面を示している。ウェル6a内で

は、液保持部 6 b の頂部に設けられたポケット内に液滴状の蛋白質溶液 1 3 が載置状態で保持されており、液保持部 6 b を囲むリング状の貯液部 6 c には、結晶化溶液 1 2 が貯溜されている。後述するように結晶化の開始に際しては、液保持部 6 b に保持された蛋白質溶液 1 3 に所定量の結晶化溶液 1 2 を貯液部 6 c から取り出して分注して混合した後、各ウェル 6 a 上面に密封用のシール部材 1 4 が貼着される（図 4 参照）。

#### 【0020】

この状態の結晶化プレート 6 を所定の温度雰囲気下で保管することにより、蛋白質溶液 1 3 中の溶媒成分を蒸発させ、これにより蛋白質溶液 1 3 の蛋白質濃度を過飽和状態にまで高めて蛋白質結晶を生成する。このとき、蛋白質溶液 1 3 から蒸発する溶媒と結晶化溶液 1 2 に吸収される蒸気とが平衡状態を保ちながら蛋白質溶液 1 3 からの溶媒の蒸発が緩やかに進行することにより、安定した結晶生成が行われる。

#### 【0021】

観察部 9 はこのような結晶生成過程の結晶化プレート 6 を観察することにより、各ウェル 6 a における蛋白質結晶の有無や結晶化の度合いを検出する。すなわち、図 6 (a) に示すように、観察ステージ 9 b にセットされた結晶化プレート 6 をカメラ 1 0 の下方に水平移動させて、観察対象のウェル 6 a 内の液保持部 6 b をカメラ 1 0 の撮像光軸に位置合わせするとともに、観察ステージ 9 b を昇降させてウェル 6 a 内における撮像対象の断面位置をカメラ 1 0 の合焦レベル f に合わせる。そして下方の照明装置 1 1 から照明光を照射した状態で、カメラ 1 0 によって結晶化プレート 6 を撮像することにより、結晶化プレート 6 に保持された蛋白質溶液のレイヤー画像（図 1 4 参照）が取り込まれる。

#### 【0022】

このカメラ 1 0 による撮像において、観察ステージ 9 b の Z 位置を調整することにより、ウェル 6 a の凹部内に保持された蛋白質溶液 1 3 内における任意の水平断面の画像を取得することができる。すなわち観察ステージ 9 b を所定ピッチで合焦方向（Z 方向）に移動させながら、カメラ 1 0 で蛋白質溶液 1 3 を撮像することにより、図 6 (b) に示すように、蛋白質溶液 1 3 において合焦方向の位置が異なる複数の水平断面を示すレイヤー L 1, L 2, L 3, L 4, L 5 の画像（以下、「レイヤー画像」と略称する。）が各断面毎に取り込まれる。すなわち、カメラ 1 0 は、観察ステージ 9 b において蛋白質溶液 1 3 を合焦方向の位置が異なる複数の断面毎に撮像し、各断面における画像を示す複数のレイヤー画像を取り込む。

#### 【0023】

なお、図 4、図 5 は、結晶生成過程において蛋白質溶液 1 3 を載置状態で下方から支持するシッティングドロップ法を用いた蒸気拡散法において用いられる結晶化プレート 6 の例を示しているが、これ以外にも、図 7 に示すようなウェル形状の結晶化プレート 6 0 を使用してもよい。この結晶化プレート 6 0 は、蛋白質溶液 1 3 の液滴を垂下状態で保持するハンギングドロップ法において用いられる。

#### 【0024】

この例では、ウェル 6 0 A は結晶化溶液 1 2 を貯溜する貯液部を有するのみで液保持部は形成されておらず、結晶化対象の蛋白質溶液 1 3 の液滴（所定量の結晶化溶液 1 2 が混合されたもの）は、ウェル 6 0 A を閉塞するガラス板 1 4 A の裏面に垂下状態で保持される。すなわち蛋白質溶液 1 3 が滴下されたガラス板 1 4 A を反転して、結晶化溶液 1 2 が分注されたウェル 6 0 A を塞ぐように貼着してウェル 6 0 A を密封する。

#### 【0025】

次に、図 8 を参照して、蛋白質結晶検出装置の制御系の構成を説明する。図 8 において、蛋白質結晶検出装置 1 は通信インターフェイス 1 7 を備えており、通信インターフェイス 1 7 は、LAN システム 1 6 を介して蛋白質結晶検出装置 1 内部の制御処理を行う処理部 2 0 と、上位制御部であるホストコンピュータ 1 5 との制御信号の授受を行う。

#### 【0026】

処理部 2 0 は、データ記憶部 2 1 に記憶された各種データに基づいて、プログラム記憶部 2 2 に記憶された各種処理プログラムを実行することにより、後述する各種動作および



処理機能を実現する。ここでは、プログラム記憶部 22 には、結晶検出プログラム 22 a、観察動作プログラム 22 b が記憶されており、これらのプログラムを実行することにより、後述する蛋白質溶液の観察動作および蛋白質溶液中の蛋白質結晶検出処理が行われる。

#### 【0027】

データ記憶部 21 は、処理画像記憶部 21 a、観察画像記憶部 21 b、結晶化情報記憶部 21 c、ストレージ情報記憶部 21 d、レイヤー情報記憶部 21 e および結晶判定基準記憶部 21 f を備えている。処理画像記憶部 21 a は、蛋白質結晶検出処理において各種の処理が行われた後の処理画像を記憶する。観察画像記憶部 21 b は、観察ステージ 9 b においてカメラ 10 によって蛋白質溶液 13 を合焦方向の位置が異なる複数の断面毎に撮像して取り込まれた複数のレイヤー画像を記憶する（図 14 参照）。後述する蛋白質結晶検出処理においては、観察画像記憶部 21 b に記憶された各レイヤー画像が処理対象となる。

#### 【0028】

結晶化情報記憶部 21 c は、結晶化情報、すなわち蛋白質結晶検出処理において結晶化が検出されたレイヤー画像の画像データや、レイヤー画像が取得されたプレート・ウェルを特定する情報および当該プレートを観察した観察時刻などの情報を記憶する。ストレージ情報記憶部 21 d は、ストレージ部 5 における結晶化プレート 6 のストレージ情報、すなわち各収納部 5 a と結晶化プレート 6 との対応関係を示すプレート配列データを記憶する。

#### 【0029】

レイヤー情報記憶部 21 e は、各レイヤー画像から後述する一連の画像処理によって生成された画像（以下、「結晶特徴画像」と略称する。）に含まれる蛋白質結晶の特徴部分を数値化した情報（以下、「レイヤー情報」と略称する。）を記憶する。結晶判定基準記憶部 21 f は、レイヤー情報記憶部 21 e に記憶されたレイヤー情報に基づいて蛋白質溶液中の蛋白質結晶の生成状況を判定する結晶化判定処理において、判定基準として用いられるしきい値データを記憶する。

#### 【0030】

また処理部 20 には、表示部 23、操作・入力部 24、カメラ 10、照明装置 11、観察ステージ 9 b、搬入口開閉機構 25、搬送ユニット 7 および温調ユニット 26 が接続されている。温調ユニット 26 は、ホストコンピュータ 15 から処理部 20 を経由して送られる温度指令に従って恒温室 2 の温度調整を行う。これにより、恒温室 2 内部の温度が設定温度に保たれる。

#### 【0031】

搬送ユニット 7 は、処理部 20 からの制御信号に従って、恒温室 2 内における結晶化プレート 6 の搬送、すなわち恒温室 2 に設けられた搬入口 2 a を介して搬入される結晶化プレート 6 をストレージ部 5 の所定の収納部 5 a に収納する動作や、収納部 5 a から結晶化プレート 6 を取り出して観察部 9 へセットする動作などの搬送動作を行う。搬入口開閉機構 25 は、処理部 20 からの制御信号に従って搬入口 2 a の開閉を行う。

#### 【0032】

また処理部 20 が観察ステージ 9 b、照明装置 11、カメラ 10 を制御することにより、観察ステージ 9 b に保持された結晶化プレート 6 の移動、照明装置 11 による結晶化プレート 6 の照明、カメラ 10 による蛋白質溶液の画像の取り込みが実行される。表示部 23 は、カメラ 10 によって取り込まれたレイヤー画像や各種の処理画像、データ入力時の案内画像などを制御パネル 4 の表示パネルに表示する。操作・入力部 24 は、制御パネル 4 などの入力装置を操作することにより、処理部 20 に対して操作指令やデータ入力を行う。

#### 【0033】

次に図 9 の機能ブロック図を参照して、蛋白質結晶検出処理機能について説明する。図

9において、微分処理部30は、観察画像記憶部21bに記憶されているレイヤー画像（図14参照）を微分処理することにより、輝度変化の大きさを示す輝度変化情報から成るレイヤー微分画像を生成する（図15参照）。ここで輝度変化情報とは、レイヤー画像を構成する各画素における輝度の変化率を数値（輝度変化値）で示すものである。

#### 【0034】

レイヤー画像中では、背景領域や照明光が透過した部分など観察対象が存在しない領域では輝度変化は小さく、検出対象の蛋白質結晶の輪郭に該当する部分では輝度変化は大きい。したがって上述のレイヤー微分画像においては、画像に取り込まれた観察対象物の輪郭が輝度変化の大きい部分として抽出される。但し、このレイヤー微分画像においては、検出目標である蛋白質結晶のみならず、蛋白質溶液内に存在する結晶以外の沈殿物などの固形異物や、ウェル6a内の液保持部6bの形状や液滴の輪郭なども同様に輝度変化の大きい部分として抽出されるため、これらの検出目標以外の輝度変化の大きい部分をノイズとして除去するノイズ除去処理（後述）が行われる。

#### 【0035】

微分画像記憶部31は、微分処理部30で生成されたレイヤー微分画像を記憶する。二値化処理部32は、微分画像記憶部31のレイヤー微分画像を特徴部分抽出用の閾値で二値化することにより、輝度変化情報のうち大きな輝度変化を示す輝度変化情報を、前述の特徴部分として残したレイヤー二値化画像を得る（図18参照）。そして二値化画像記憶部33は、二値化処理部32で得られたレイヤー二値化画像を記憶する。ここで、二値化処理部32による二値化処理の対象となるレイヤー微分画像に対しては、以下に説明するマスク処理、ノイズ除去処理が実行される。そして除去の対象となるノイズを認識することを目的として、ノイズ除去処理に先立ってノイズ抽出用の二値化処理および細線化処理が実行される。

#### 【0036】

まずマスク処理について説明する。マスク情報記憶部36は、マスク情報、すなわち本来観察対象とする蛋白質溶液のレイヤー画像中に含まれるノイズのうち、容器である結晶化プレート6の形状に由来して現れる容器ノイズを微分画像から除去するためのマスク情報（ここでは、液保持部6bに設けられたポケットの径寸法）を記憶する。容器ノイズとは、レイヤー画像内において蛋白質溶液を保持する結晶化容器である結晶化プレート6の形状（液保持部6bの形状）に由来してレイヤー微分画像に現れる輝度変化情報である。マスク処理部35は、マスク情報記憶部36に記憶されたマスク情報に基づき、微分画像から容器ノイズを除去するマスク処理を行う。これにより、容器ノイズが除去されたレイヤー微分画像が得られる（図16参照）。

#### 【0037】

次にノイズ除去処理について説明する。ここで行われるノイズ除去処理は、上述のマスク処理では除去できないノイズ、例えば液保持部6b頂部のポケット内に現れる蛋白質溶液の液滴の輪郭など、予め教示することができないノイズを対象としたものである。このため、ここでは微分画像中の情報からどの部分がノイズであるかをノイズ認識処理部38によって認識し、このノイズ認識結果に基づきノイズ除去処理部37が微分画像中のノイズ除去を行う。これにより、ノイズが除去されたレイヤー微分画像が得られる（図16参照）。

#### 【0038】

ここでは、ノイズ認識の手法として、レイヤー微分画像を細線化したレイヤー細線化画像中の線の形状的特徴に基づき、これらの線が蛋白質結晶を示す図形の輪郭などの形状を示す形状線であるか、もしくは液滴の輪郭など明らかに蛋白質結晶を示す図形とは異なる線であるかを識別するようにしている。

#### 【0039】

すなわちここに示すノイズ認識においては、まず二値化処理部39により、微分画像記憶部31に記憶されたレイヤー微分画像をノイズ抽出用の閾値で二値化処理する。そして細線化処理部40は、二値化処理されたレイヤー二値化画像を細線化処理する。すなわち

、レイヤー二値化画像中の各線要素を1画素幅の細い線に置き換える。これにより、レイヤー微分画像中の輝度変化が大きい部分を示す範囲が細線化された複数の線から成るレイヤー細線化画像が生成され（図17参照）、生成されたレイヤー細線化画像は、細線化画像記憶部41に記憶される。

#### 【0040】

ノイズ認識処理部38は、細線化画像記憶部41のレイヤー細線化画像に含まれる複数の線の形状を個々に認識することにより、ノイズとみなす線を検出する。ノイズ除去処理部37は、微分画像記憶部31に記憶されたレイヤー微分画像から、ノイズ認識処理部38でノイズとみなされて検出された線に該当する輝度変化情報を除去する。

#### 【0041】

ここで、ノイズ認識処理部38がノイズとみなす線を検出する手法として、以下に概説する複数のアルゴリズムを用いている。すなわち、線の長さおよび分岐数を求め、長さが所定値を超え且つ分岐数が少ない線をノイズとみなす第1のアルゴリズム、線の長さおよび直線性を認識し、長さが所定値を超え且つ直線性が高い線をノイズとみなす第2のアルゴリズム、さらには線の長さおよび当該線の近似直線に対する分散度合いを求め、長さが所定値を超え且つ分散度合いが小さい線をノイズとみなす第3のアルゴリズムの3つを必要に応じて使い分け、または併用するようにしている。

#### 【0042】

なお、マスク処理部35による容器ノイズ除去処理、ノイズ除去処理部37によるノイズ除去処理においては、上記例では微分画像記憶部31に記憶された微分画像を処理対象として実行する例を示しているが、二値化画像記憶部33に記憶されたレイヤー二値化画像を対象としてマスク処理部35による容器ノイズ除去処理、ノイズ除去処理部37によるノイズ除去処理を実行するように構成してもよい。

#### 【0043】

レイヤー情報抽出部34は、二値化画像記憶部33に記憶されたレイヤー二値化画像から、前述のレイヤー情報を抽出する処理を行う。抽出されたレイヤー情報は、レイヤー情報記憶部21eに記憶される。そして結晶化判定部43は、レイヤー情報記憶部21eに記憶されたレイヤー情報に基づいて、蛋白質溶液中の蛋白質結晶の生成状況を判断する。

#### 【0044】

上記構成において、図9に示す鎖線枠42で包括される各要素、すなわち微分処理部30、微分画像記憶部31、二値化処理部32、二値化画像記憶部33、マスク処理部35、マスク情報記憶部36、ノイズ除去処理部37、ノイズ認識処理部38、二値化処理部39、細線化処理部40、細線化画像記憶部41は、観察画像記憶部21bに記憶された各レイヤー画像から、蛋白質結晶の特徴部分を抽出した結晶特徴画像、すなわちレイヤー二値化画像を各レイヤー画像毎に生成する結晶特徴画像生成部42を構成している。

#### 【0045】

この蛋白質結晶検出装置は上記のように構成されており、次に蛋白質結晶を検出するための観察動作について、図10をのフローを参照して説明する。この観察動作は、処理部20が観察動作プログラム22bを実行することにより行われ、観察動作開始に際しては、上流側装置から搬入口2aを介して搬入された結晶化プレート6は、収納部5aに収容・保管されている。

#### 【0046】

まず図10において、指定された結晶化プレート6を搬送ユニット7によってストレージ部5から取り出して観察ステージ9bへ移動する（ST1）。そして先頭のウェル6aをカメラ10の直下の観察位置に位置決めする（ST2）。この後、照明装置11を点灯して、カメラ10によって画像取り込みを実行する（ST3）。すなわち、観察ステージ9bにおいて結晶化プレート6に保持された蛋白質溶液13を合焦方向が異なる複数の断面毎に撮像して、複数のレイヤー画像を取り込む（画像取込工程）。取り込まれた複数のレイヤー画像は、観察画像記憶部21bに記憶される（画像記憶工程）。

#### 【0047】



この後、観察画像記憶部21bに記憶されたレイヤー画像に基づき、後述する蛋白質結晶検出処理が実行される(ST4)。そして当該ウェルを対象とした蛋白質結晶検出処理が終了したならば、次のウェルの有無を判断する(ST5)。ここで次のウェルがある場合には、次のウェルを観察位置に位置決めし(ST6)、(ST3)に戻って同様の処理を反復実行する。そして(ST5)にて次のウェル無しと判断されたならば、処理が完了した結晶化プレート6を収納部5aに返却する(ST7)。そしてホストコンピュータ15に観察動作終了を通知して(ST8)、観察動作実行処理を終了する。

#### 【0048】

上述の観察動作において、結晶化プレート6を恒温室2から外部に持ち出すことなく全ての動作を行うことが可能となっている。これにより、観察の都度結晶化プレートを持ち出す方式と比較して、結晶化プレートの温度条件が変化することによる結晶育成条件のばらつきを排除してスクリーニング精度を向上させることができる。さらに、結晶化プレートを冷却状態から室温に曝す際に生じる結露による観察視野の曇りが発生せず、良好な観察結果を得ることが可能であり、蛋白質結晶検出のための観察作業を効率よく高い信頼性で行うことができる。

#### 【0049】

次に、(ST3)において取り込まれたレイヤー画像および(ST4)にて実行される蛋白質結晶検出処理について説明する。まず観察対象の蛋白質溶液13の経時変化について、図13を参照して説明する。前述のように結晶化生成の開始に際しては、ウェル6aの液保持部6bには、所定割合の結晶化溶液12が加えられた蛋白質溶液13の液滴が載置される(図5参照)。図13(a)は、結晶化生成の初期における液保持部6bの断面を示しており、この段階では蛋白質溶液13の液滴は液保持部6bのポケットをほぼ満たした状態にあり、液滴内部には未だ蛋白質結晶が見られない。

#### 【0050】

ここで結晶生育条件、すなわち結晶化溶液12の組成・濃度や保管温度が望ましい条件に適っている場合には、蛋白質溶液13内では時間の経過とともに結晶化が進行する。図13(b)は、結晶化がある程度進行した状態における液保持部6bの断面を示している。この状態では、蛋白質溶液13中の溶媒成分が徐々に蒸発することにより、液保持部6bのポケット内で液滴が縮小するにつれて液滴の輪郭(矢印Bで示す)が、図13(a)の状態よりもポケット内部側に移動している。そして液滴の縮小によって露呈したポケット底面には、液滴内に含まれていた蛋白質が結晶化した蛋白質結晶13aが残留している。さらに液滴内部においても結晶化が進行し、蛋白質結晶13aが生成されている。

#### 【0051】

図14は、図13(b)に示す状態におけるレイヤー画像を示しており、液保持部6bのポケット内で溶媒の蒸発がある程度進行し体積が縮小した状態の液滴を上方から取り込んだ画像が含まれている。このレイヤー画像中では、図14に示すように、低輝度の背景画像(密ハッチング部で示す)中に、液保持部6bの頂部を示す環状部分A(疎ハッチング部で示す)が比較的高い輝度で現れている。

#### 【0052】

そしてこの環状部分Aの内側のポケット内には、蛋白質溶液13の液滴が輝度が部分によって異なる画像として現れている。ここで、環状部分Aの内側で液滴が存在しない部分は下方からの照明光(図13(b)参照)が透過することによって高輝度部分となっており、蛋白質溶液13の液滴の輪郭Bはこの高輝度部分とのコントラストによってレイヤー画像中で明瞭に現れている。また環状部分Aの内周に沿って、部分的に線状の高輝度部分Cが現れている。

#### 【0053】

そして検出対象の蛋白質結晶13aは、環状部分Aの内側の領域に存在している。すなわち、蛋白質溶液13の液滴内部に存在する蛋白質結晶13aのうち、カメラ10による合焦レベルf(図13(b)参照)の近傍に存在する蛋白質結晶13aは、図14のレイヤー画像中で合焦度が高く明瞭に現れ、合焦レベルfから外れた位置にある蛋白質結晶1



3 a は合焦度が低くぼやけた輪郭で現れる。またポケットの表面に残置された形で存在する液滴外の蛋白質結晶 1 3 a も同様に、合焦度が低くぼやけた輪郭で現れる。さらにこれ以外にも、レイヤー画像中には結晶化に至らなかった沈殿物などの固形異物が存在する。

#### 【0054】

蛋白質結晶の検出において、レイヤー画像中に現れるこれらの図形を目視観察によって正確に識別することは困難であり、検出対象の蛋白質結晶を高い信頼度で効率よく検出することができないため、本実施の形態に示す蛋白質結晶検出方法では、プログラム記憶部 2 2 に記憶された結晶検出プログラム 2 2 a を処理部 2 0 が実行することにより、複数のレイヤー画像（図 6（b）に示す複数のレイヤー L 1 ～ L 6 参照）に対して図 1 1 のフローに示す蛋白質結晶検出処理を行い、蛋白質結晶の識別を自動的に行わせるようにしている。

#### 【0055】

処理開始に際しては、レイヤー番号を特定するためのカウンタ値 K を初期値 0 にセットし（S T 1 1）、次いでカウンタ値 K に 1 を加算し（S T 1 2）、その後以下の処理が実行される。まずレイヤー画像に対して微分処理を行う（S T 1 3）。すなわち、予め観察画像記憶部 2 1 b に記憶された蛋白質溶液のレイヤー画像を微分処理することにより、輝度変化の大きさを示す輝度変化情報からなるレイヤー微分画像を生成する。これにより、図 1 5 に示すように、図 1 4 のレイヤー画像中に現れている蛋白質結晶 1 3 a の外形を示す形状線や、液滴の輪郭 B、環状部分 A の内周の高輝度部分 C など、輝度変化が大きい部分が高輝度で現れる。なお、レイヤー微分画像は本来各画素が輝度変化値に応じた明るさで現れる多値画像であるが、図 1 5 では図示の便宜のため白黒二値画像で表している。

#### 【0056】

次いで、このレイヤー微分画像に対してマスク処理を行う（S T 1 4）。ここでは、蛋白質溶液 1 3 を保持している結晶化プレート 6 の液保持部 6 b に由来する輝度変化情報を、容器ノイズとしてレイヤー微分画像から除去する。容器ノイズ除去は、結晶化プレート 6 の液保持部 6 b の形状として予め教示されているマスク情報に基づいて、蛋白質溶液 1 3 が保持されている可能性のない所定領域の輝度変化情報を除去することにより行われる。

#### 【0057】

ここでは、図 1 5 に示すレイヤー微分画像中の輝度変化情報のうち、蛋白質溶液 1 3 が保持されている範囲以外に存在する輝度変化が大きい部分、すなわち図 1 4 に示す環状部分 A の内周部を含んでこれらよりも外側の領域に現れる輝度変化が大きい部分をノイズとして除去する。これにより、図 1 6 に示すように、蛋白質結晶が存在する可能性がある領域のみを含んだレイヤー微分画像（マスク処理）が得られる。

#### 【0058】

このようにしてマスク処理が行われたレイヤー微分画像をノイズ抽出用の閾値で二値化処理し、さらに細線化処理を行う（S T 1 5）。図 1 7 は、この細線化処理によって得られたレイヤー細線化画像を示しており、レイヤー微分画像中の高輝度部分、すなわちタンパク質結晶 1 3 a の形状線や液滴の輪郭などは、いずれも幅が 1 画素の線に置き換えられている。

#### 【0059】

そしてこのようにして作成されたレイヤー細線化画像に含まれるノイズを認識する（S T 1 6）。すなわちレイヤー細線化画像に含まれる複数の線の形状を個々に認識することにより、ノイズとみなす線を検出する。そしてレイヤー微分画像に対してノイズ除去処理を行う（S T 1 7）。すなわち、（S T 1 6）においてノイズとみなされて検出された線を、二値化処理されたレイヤー微分画像から除去する。図 1 8 は、このノイズ除去処理によって得られたレイヤー部分画像（ノイズ除去）を示している。

#### 【0060】

この後、蛋白質結晶に該当する可能性が高い特徴部分の抽出を行う。まず、レイヤー微分画像（ノイズ除去）を特徴部分抽出用の閾値で二値化処理する（S T 1 8）。これによ

り、大きな輝度変化を示す輝度変化情報を特徴部分として残したレイヤー二値化画像を得る。ここで用いられる閾値は、前述のノイズ抽出用の閾値よりも高い値に設定される。

#### 【0061】

この二値化処理工程においては、特徴部分についてラベリングを行い、面積が所定値よりも大きいラベルのみを残してその他を消去する処理を併せて行う。これにより、蛋白質結晶である可能性が少ない小さな特徴部分がノイズとみなされて除去される。図19はこのようなして得られたレイヤー二値化画像を示しており、この画像中には蛋白質結晶である可能性が高い特徴部分のみが現れている。すなわちレイヤー二値化画像は、各レイヤー画像から蛋白質結晶の特徴部分を抽出した結晶特徴画像となっており、(ST13)～(ST18)にて実行される処理は、各レイヤー画像から蛋白質結晶の特徴部分を抽出した結晶特徴画像を、各レイヤー画像毎に生成する結晶特徴画像生成工程となっている。得られたレイヤー二値化画像は、二値化画像記憶部33に記憶される。

#### 【0062】

次いで、得られたレイヤー二値化画像の画素数とラベル数をカウントする(ST19)。ここでは各レイヤー二値化画像において、特徴部分に該当する高輝度部分の画素の総数を示す画素数と、これらの高輝度の画素のかたまりであるラベルの総数を示すラベル数を求める。これにより、結晶特徴画像に含まれる特徴部分を数値化したレイヤー情報が、各レイヤー画像毎に求められる(レイヤー情報抽出工程)。すなわち本実施の形態においては、レイヤー情報は少なくとも蛋白質結晶の特徴部分に該当する画素の数と、これらの画素のかたまりであるラベルの数とを含んでいる。

#### 【0063】

(表1)は、図11の処理によって求められたレイヤー情報の例を示している。ここでは、全レイヤー数nが5の場合の例を示しており、各レイヤー番号L1～L5毎に、画素数およびラベル数が求められている。

#### 【0064】

【表1】

レイヤー番号	画素数	ラベル数
L1	1013	36
L2	2381	71
L3	5902	184
L4	8055	268
L5	4442	174

#### 【0065】

なお、前述の容器ノイズ除去のためのマスク処理、ノイズ除去処理を、二値化画像記憶部33に記憶されたレイヤー二値化画像を対象として行うようにしてもよい。この場合には、レイヤー二値化画像中に残された特徴部分のうち、ノイズとみなされた検出された線に該当するものをレイヤー二値化画像から除去する。

#### 【0066】

次いでカウンタ値Kを参照し、この値が全レイヤー数n(図6(b)に示す例ではn=5)に到達していなければ、(ST12)に戻って次のレイヤー画像を対象として、(S

T 1 3) ~ (S T 1 9) の処理を実行する。そして (S T 2 0) にて、カウント値 K が全レイヤー数 n に到達したことが確認されて、全てのレイヤー画像についてレイヤー情報を求める処理が完了したならば、結晶化判定を実行し (S T 2 1)、当該ウェルにおける蛋白質結晶の生成状況を判定する (結晶化判定工程)。そして結晶化情報記憶部 2 1 c に、上記判定結果を結晶化プレート情報として、ウェル情報、観察画像、観察時刻とともに記憶する (S T 2 2)。これにより、1 つのウェル 6 a を対象とした蛋白質結晶検出処理が終了し、同様の処理が他のウェルを対象として反復実行される。

#### 【0067】

次に、上述の処理の (S T 2 1) にて蛋白質結晶の生成状況を判断するために実行される結晶化判定の詳細について、図 1 2 のフローに沿って説明する。最初に、ここで使用される語句および記号の定義を説明する。(表 1) において、最大の画素数を有するレイヤー二値化画像に対応するレイヤーを、蛋白質結晶が存在する可能性が最も高い代表レイヤーと定義する。(表 1) に示す例では、レイヤー L 4 が代表レイヤーである。代表画素数は、この代表レイヤーに対応するレイヤー二値化画像における特徴部分の画素数を意味している。そして代表レイヤーに隣接する上下 2 つのレイヤーのうち、より大きい画素数に対応したレイヤー (表 1) に示す例では、代表レイヤー L 4 に対して上側に隣接するレイヤー L 3) を、複数のレイヤー間相互の相対関係を数値データ化する対象となる対象隣接レイヤーと定義しており、この対象隣接レイヤーに対応する画素数が隣接レイヤー画素数となる。

#### 【0068】

代表ラベル数は、代表レイヤーのレイヤー二値化画像における特徴部分の画素のかたまり (ラベル) の数を意味している。また最大ラベル画素数は、全レイヤーを通して最大サイズのラベルの画素数を示す。代表画素数、最大ラベル画素数は、いずれもその値が大きいほど蛋白質結晶化が進行している可能性が高いことを意味している。

#### 【0069】

そして (数 1) - (1) に示すように、代表平均画素数は、代表画素数を代表ラベル数で除した数値であり、1 つのラベルあたりの平均的な画素数を示している。代表平均画素数が大きいほど、特徴部分が大きなサイズで検出されたことを意味しており、したがって蛋白質結晶の存在可能性が高いこととなる。

#### 【0070】

また (数 1) - (2) に示すレイヤー間非変動率は、上述の隣接レイヤー画素数を代表画素数で除した比率を % で表示した数値であり、隣接する断面のレイヤー画像間におけるレイヤー情報の相対関係から求められるものである。レイヤー間非変動率が大きいほど、ある厚みを介して隣接した 2 つのレイヤーにわたって、同一の物質が存在している蓋然性が高く、したがって蛋白質結晶の存在可能性が高いことを意味する。

#### 【0071】

##### 【数 1】

$$\text{代表平均画素数} = \frac{\text{代表画素数}}{\text{代表ラベル数}} \quad \dots (1)$$

$$\text{レイヤー間非変動率} = \frac{\text{隣接レイヤー画素数}}{\text{代表画素数}} \times 100 \quad \dots (2)$$

#### 【0072】



このようなレイヤー間非変動率を求めることにより、2レイヤー間に同一の物質が共通して存在する割合を推定することができ、このレイヤー間非変動率を結晶化判定の判定パラメータとして用いることにより、後述するように、ある厚みを持った蛋白質結晶の存在と厚みが小さい沈殿物などの非結晶生成物の存在とを、数値データに基づいて識別することが可能となっている。

#### 【0073】

次に、図12の結晶化判定処理において用いられる判定パラメータおよび判定しきい値として用いられる結晶判定基準データについて説明する。上述の説明において定義した判定パラメータのうち、代表画素数、最大ラベル画素数、代表平均画素数およびレイヤー間非変動率の4つの判定パラメータが、以下に示す判定処理において用いられている。図9に示す結晶化判定部43は、これらの判定パラメータに基づいて、蛋白質溶液の結晶の生成状態を判定する。これらのうち、代表画素数、最大ラベル画素数、代表平均画素数は、各レイヤー画像単独のレイヤー情報から求められ、レイヤー間非変動率は前述のように隣接する2断面のレイヤー画像におけるレイヤー情報の相対関係から求められる。

#### 【0074】

これらの判定パラメータに対して、以下のような判定しきい値が設定されている。図12において用いられているPN1~PN5は、画素数によって規定される判定しきい値であり、ここで、PN1、PN2、PN4は代表画素数を判定パラメータとして用いる場合の判定しきい値であり、PN3、PN5は、それぞれ代表平均画素数、最大ラベル画素数を判定パラメータとする場合の判定しきい値である。またR1、R2は、前述のレイヤー間非変動率を判定パラメータとする場合の判定しきい値である。本実施の形態に示す例では、これらの判定しきい値の初期値として、以下の数値を採用している。

PN1：5000画素、PN2：500画素、PN3：40画素

PN4：500画素、PN5：200画素、R1：30%、R2：40%

#### 【0075】

以下、判定処理フローの詳細を説明する。まず、図11に示す処理にて求められた各レイヤー画像のレイヤー情報から、上述の代表画素数、最大ラベル画素数、代表平均画素数およびレイヤー間非変動率の4つの判定パラメータの値を演算しておく。そして図12において、(ST31)にて、代表画素数がPN1以上であり且つレイヤー間非変動率がR1以上であるという条件に該当するか否かを判断する。ここで、この条件に該当しているならば、蛋白質結晶に該当する特徴部分が平面的に見て所定範囲以上で検出され、且つ立体的に見て所定割合以上の部分が結晶と判断して差し支えないほどの厚みを有していると推定される。したがってこの場合には、当該ウェルには結晶ありと判定され(ST33)、これにより結晶化判定処理を終了する。

#### 【0076】

図20は、この判定アルゴリズムによって結晶ありと判定されたウェルの二値化レイヤー画像の例を示している。図20(a)に示す代表レイヤーのレイヤー二値化画像においては、PN1を超える画素数がカウントされており、代表画素数がPN1以上という条件を満たしている。そして図20(b)に示す対象隣接レイヤーのレイヤー二値化画像においても、相当数の画素数がカウントされている。したがってレイヤー間非変動率は高く(この例では約74%)、R1を大幅に上回っている。

#### 【0077】

(ST31)において、上述の条件に該当しない場合には、(ST32)に進み、代表画素数がPN4以上であり且つ最大ラベル画素数がPN5以上であるという条件に該当するか否かを判断する。ここで、この条件に該当しているならば、蛋白質結晶に該当する特徴部分が平面的に見て所定範囲以上で検出され、且つ個々のラベルで見た場合に所定サイズ以上のものが検出されていることを意味している。そしてこの場合にも同様に、当該ウェルには結晶ありと判定され(ST33)、これにより結晶化判定処理を終了する。

#### 【0078】

(ST32)において、上述の条件に該当しない場合には、(ST34)に進む。ここ



では、代表画素数がPN2以上且つPN1未満という条件と、レイヤー間非変動率がR2以上であるかもしくは代表平均画素数がPN3以上であるという条件とがともに満たされている場合には、(ST34)の条件に該当すると判断される。そしてこの場合には、当該ウェルには蛋白質結晶には至らないものの、結晶化の可能性を有する生成物ありと判定され(ST35)、これにより結晶化判定処理を終了する。

#### 【0079】

(ST34)において、上述の条件に該当しない場合には、(ST36)に進む。ここでは、代表画素数がPN2以上且つPN1未満という条件と、レイヤー間非変動率がR2未満であるという条件と、代表平均画素数がPN3未満であるという3つの条件とがともに満たされている場合には、(ST36)の条件に該当すると判断される。そしてこの場合には、当該ウェルには蛋白質結晶に該当しない沈殿物、すなわち非結晶生成物ありと判定され(ST38)、これにより結晶化判定処理を終了する。

#### 【0080】

(ST36)において、上述の条件に該当しない場合には、(ST37)に進む。ここでは、代表画素数がPN1以上という条件と、レイヤー間非変動率がR1未満であるという条件とがともに満たされている場合には、(ST37)の条件に該当すると判断される。そしてこの場合にも同様に、当該ウェルには蛋白質結晶に該当しない沈殿物、すなわち非結晶生成物ありと判定され(ST38)、これにより結晶化判定処理を終了する。

#### 【0081】

図21は、この判定アルゴリズムによって非結晶生成物ありと判定されたウェルの二値化レイヤー画像の例を示している。図21(a)に示す代表レイヤーのレイヤー二値化画像においては、PN1を超える画素数がカウントされており、代表画素数はPN1以上となっている。これに対し、図20(b)に示す対象隣接レイヤーのレイヤー二値化画像においては少ない画素数しかカウントされておらず、したがってレイヤー間非変動率は低く(この例では約19%)、R1を下回っている。

#### 【0082】

また(ST37)において、上述の条件に該当しない場合には、蛋白質結晶、生成物、非結晶生成物のいずれも存在しないと判定され(ST39)、これにより結晶化判定処理を終了する。そしてこれらの判定結果、すなわち、結晶あり、生成物あり、非結晶生成物あり、無しのいずれかの判定が、結晶化プレート情報として記憶される。

#### 【0083】

上記説明したように、本実施の形態に示す蛋白質結晶検出における結晶化判定では、代表画素数、最大ラベル画素数、代表平均画素数のように、各レイヤー画像単独のレイヤー情報から求められる判定パラメータ、レイヤー間非変動率のように隣接する断面のレイヤー画像間におけるレイヤー情報の相対関係から求められる判定パラメータに基づいて、ウェル6aの蛋白質溶液13の結晶の生成状況、すなわち蛋白質結晶と、蛋白質結晶以外の生成物の有無を判定するようにしている。

#### 【0084】

これにより、蛋白質結晶と蛋白質結晶以外の沈殿物などの生成物を、厚みの違いによって識別することが可能となり、従来技術による蛋白質結晶の検出における課題、すなわち沈殿物などの生成物と検出対象の蛋白質とを画像上で明確に識別することが困難であるという課題を解決して、蛋白質結晶を高い精度で検出できる。

#### 【0085】

なお上記実施の形態では、レイヤー二値化画像の特徴部分にノイズを含まないようにマスク処理部35やノイズ除去処理部37で処理を行っているが、容器の形状や照明の条件等によりノイズを殆ど含まないレイヤー画像が得られる場合には、マスク処理部35やノイズ除去処理部37での処理を省略することができる。また上記実施の形態では、結晶特徴画像生成部42として微分処理により蛋白質結晶の特徴部分を抽出するようにしているが、これ以外の方法、例えば、蛋白質結晶の色に着目して特徴部分を抽出するようにしてもよい。

【産業上の利用可能性】

【0086】

本発明の蛋白質結晶検出装置および蛋白質結晶検出方法は、蛋白質結晶と沈殿物などの非結晶生成物とを精度良く識別して蛋白質結晶を高い精度で検出することができるという効果を有し、生化学分野などにおいて蛋白質の構造解析に先立って行われる蛋白質結晶化処理において有用である。

【図面の簡単な説明】

【0087】

【図1】 本発明の一実施の形態の蛋白質結晶検出装置の斜視図

【図2】 本発明の一実施の形態の蛋白質結晶検出装置の透視斜視図

【図3】 本発明の一実施の形態の蛋白質結晶検出装置の断面図

【図4】 本発明の一実施の形態の蛋白質結晶検出装置に使用される結晶化プレートの斜視図

【図5】 本発明の一実施の形態の蛋白質結晶検出装置に使用される結晶化プレートの部分断面図

【図6】 (a) 本発明の一実施の形態の蛋白質結晶検出装置の観察部の部分断面図 (b) 本発明の一実施の形態の蛋白質結晶検出装置に使用される結晶化プレートの拡大部分断面図

【図7】 本発明の一実施の形態の蛋白質結晶検出装置に使用される結晶化プレートの部分断面図

【図8】 本発明の一実施の形態の蛋白質結晶検出装置の制御系の構成を示すブロック図

【図9】 本発明の一実施の形態の蛋白質結晶検出装置の処理機能を示す機能ブロック図

【図10】 本発明の一実施の形態の蛋白質結晶検出装置における観察動作のフロー図

【図11】 本発明の一実施の形態の蛋白質結晶検出方法を示すフロー図

【図12】 本発明の一実施の形態の蛋白質結晶検出方法における結晶化判定処理のフロー図

【図13】 本発明の一実施の形態の蛋白質結晶検出装置に使用される結晶化プレートの部分断面図

【図14】 本発明の一実施の形態の蛋白質結晶検出方法におけるレイヤー画像を示す図

【図15】 本発明の一実施の形態の蛋白質結晶検出方法におけるレイヤー微分画像を示す図

【図16】 本発明の一実施の形態の蛋白質結晶検出方法におけるレイヤー微分画像（マスク処理）を示す図

【図17】 本発明の一実施の形態の蛋白質結晶検出方法におけるレイヤー細線化画像を示す図

【図18】 本発明の一実施の形態の蛋白質結晶検出方法におけるレイヤー微分画像（ノイズ除去）を示す図

【図19】 本発明の一実施の形態の蛋白質結晶検出方法におけるレイヤー二値化画像を示す図

【図20】 本発明の一実施の形態の蛋白質結晶検出方法におけるレイヤー二値化画像を示す図

【図21】 本発明の一実施の形態の蛋白質結晶検出方法におけるレイヤー二値化画像を示す図

【符号の説明】

【0088】

6 結晶化プレート

6a ウェル

6 b 液保持部

9 観察部

9 c 観察ステージ

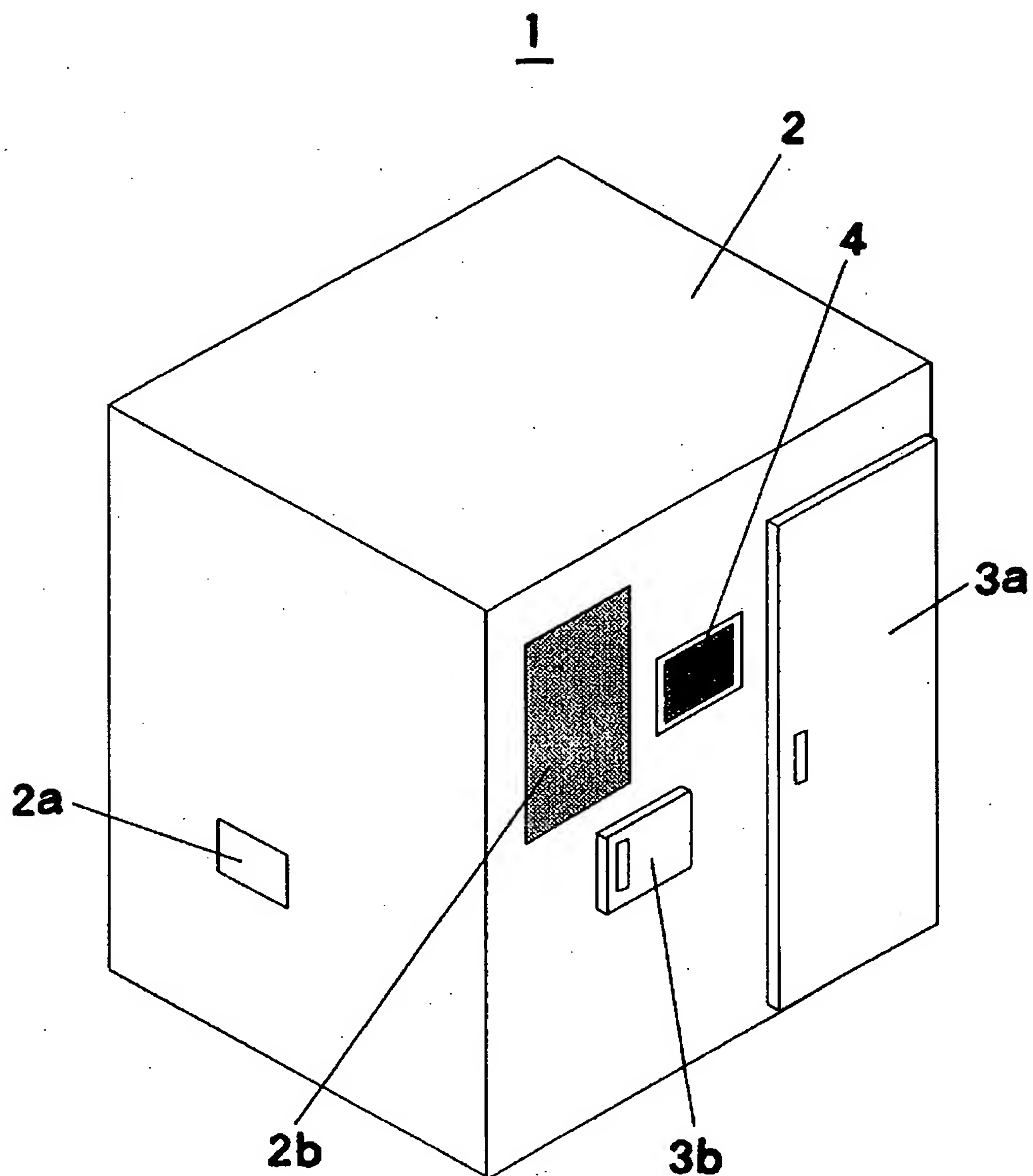
1 0 カメラ

1 2 結晶化溶液

1 3 蛋白質溶液

1 3 a 蛋白質結晶

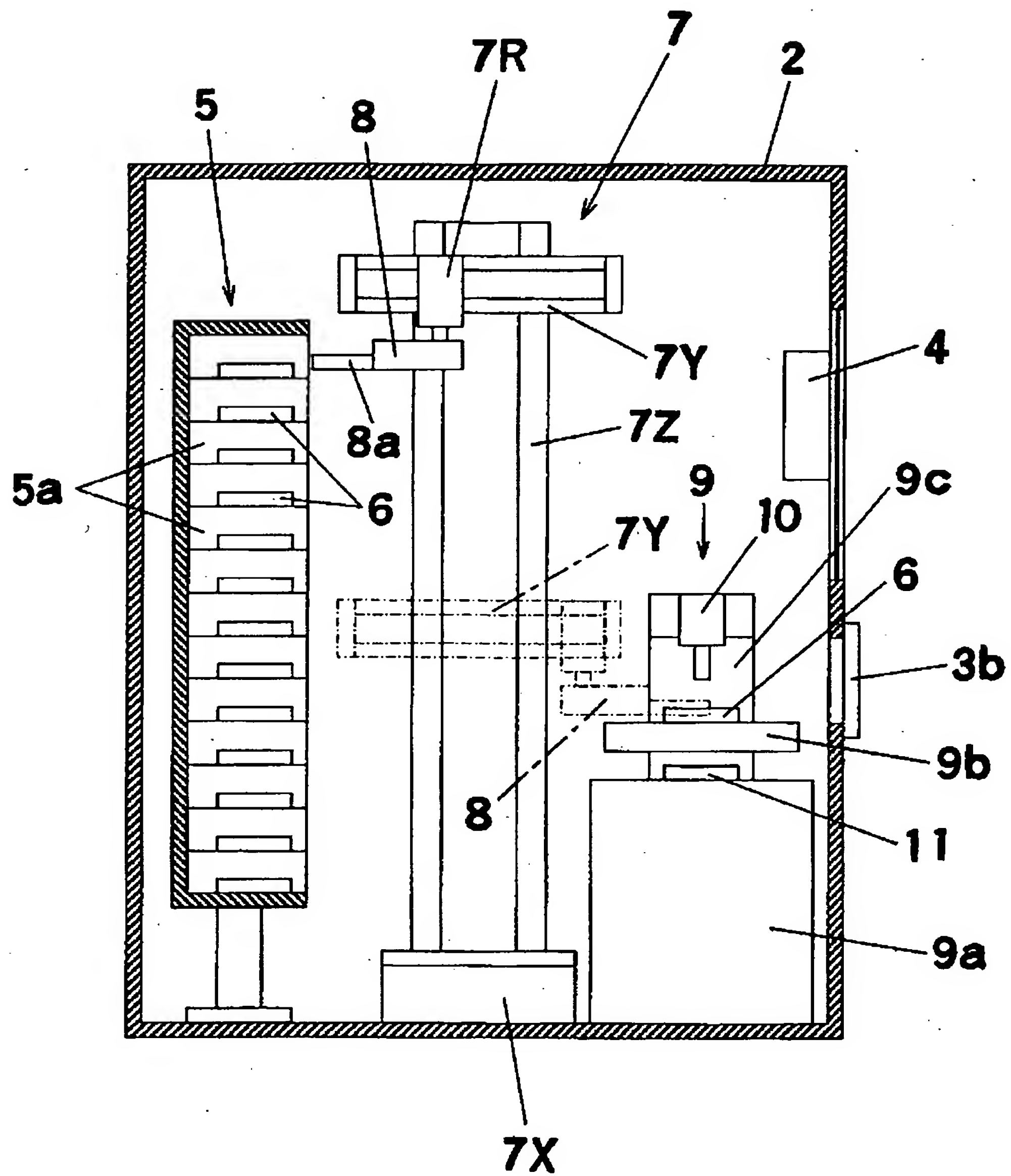
【書類名】 図面  
【図 1】



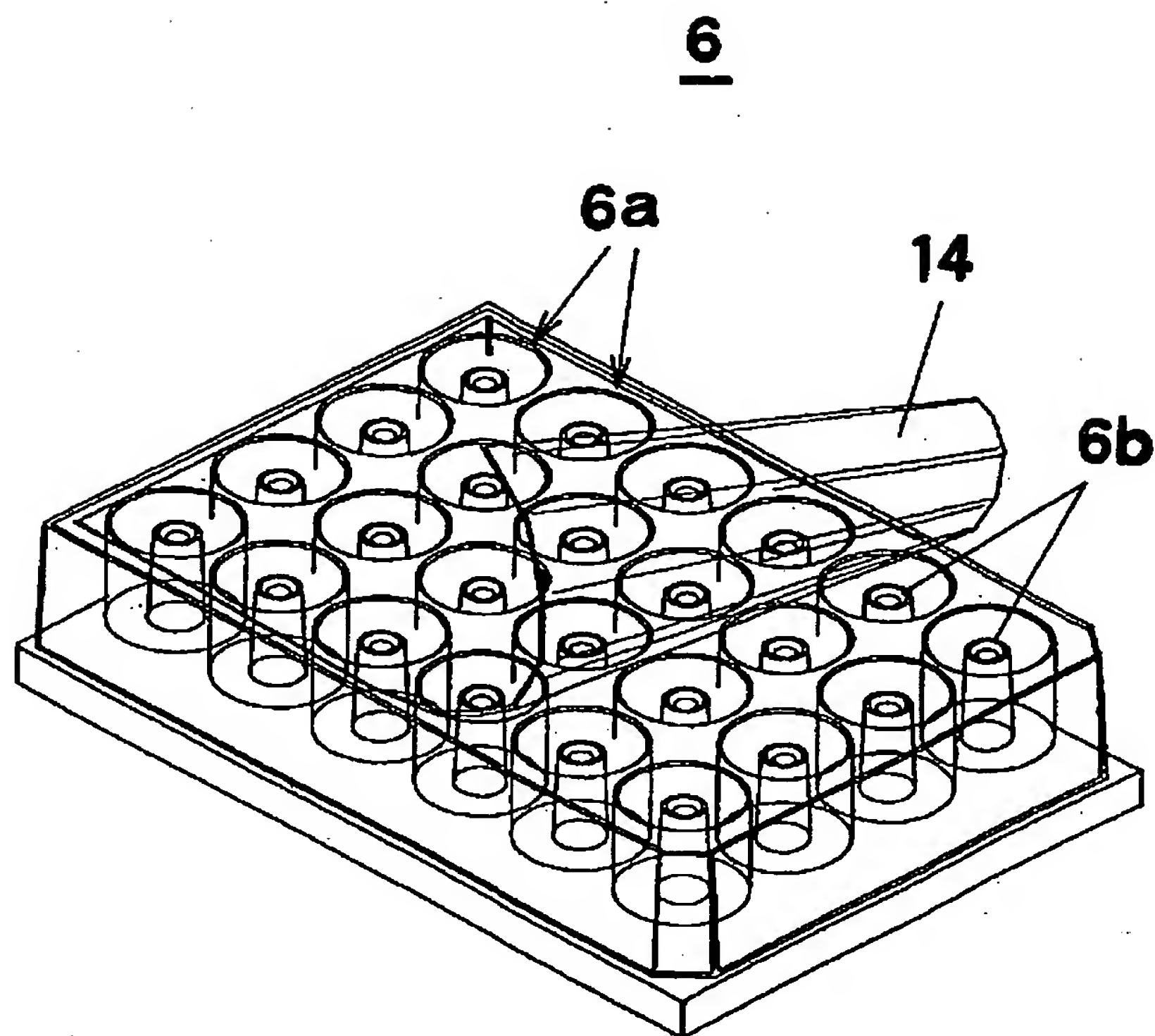


- 6 結晶化プレート  
9 観察部  
9c 観察ステージ  
10 カメラ

【図 3】

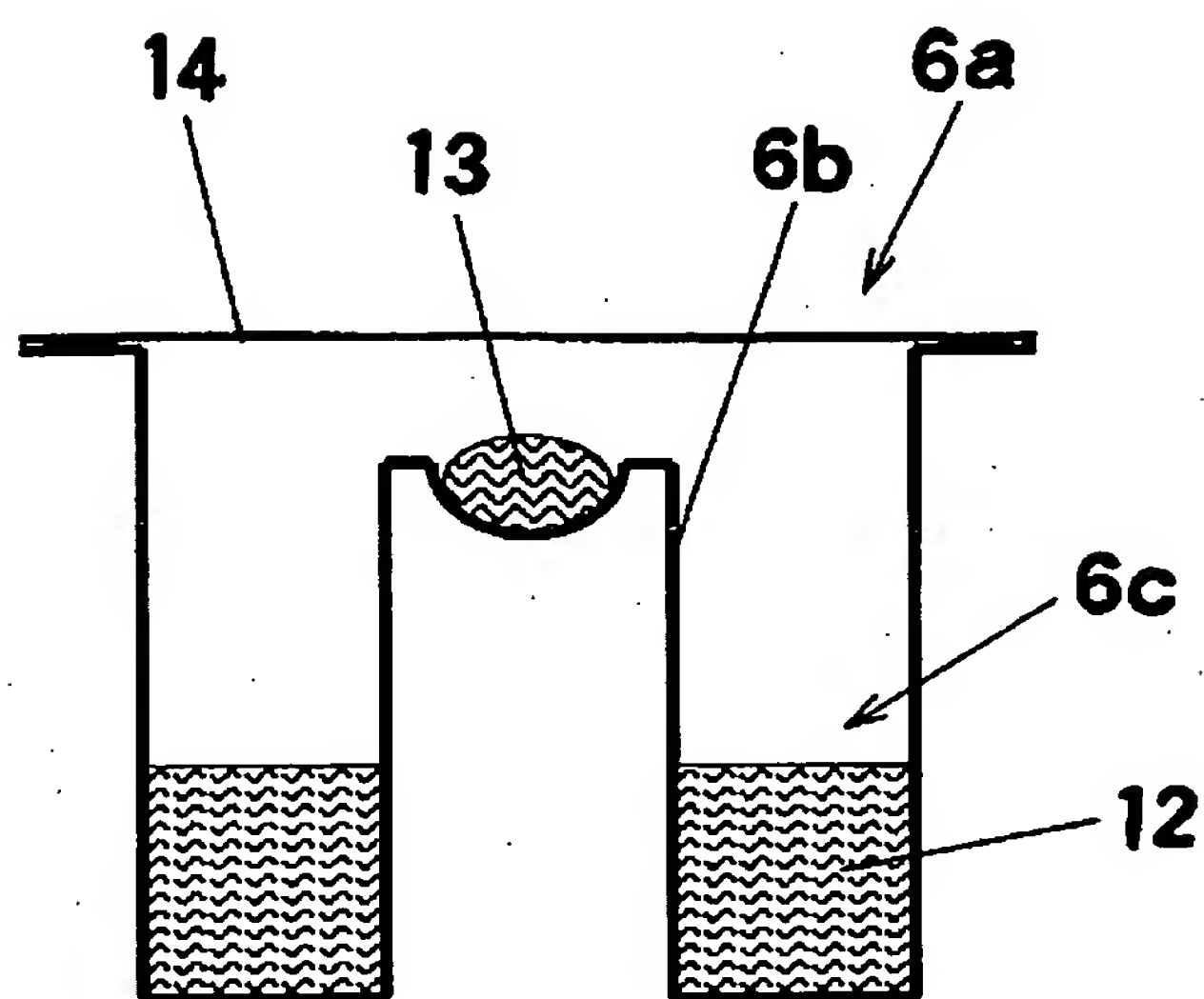


【図 4】



6 a ウェル  
6 b 液保持部

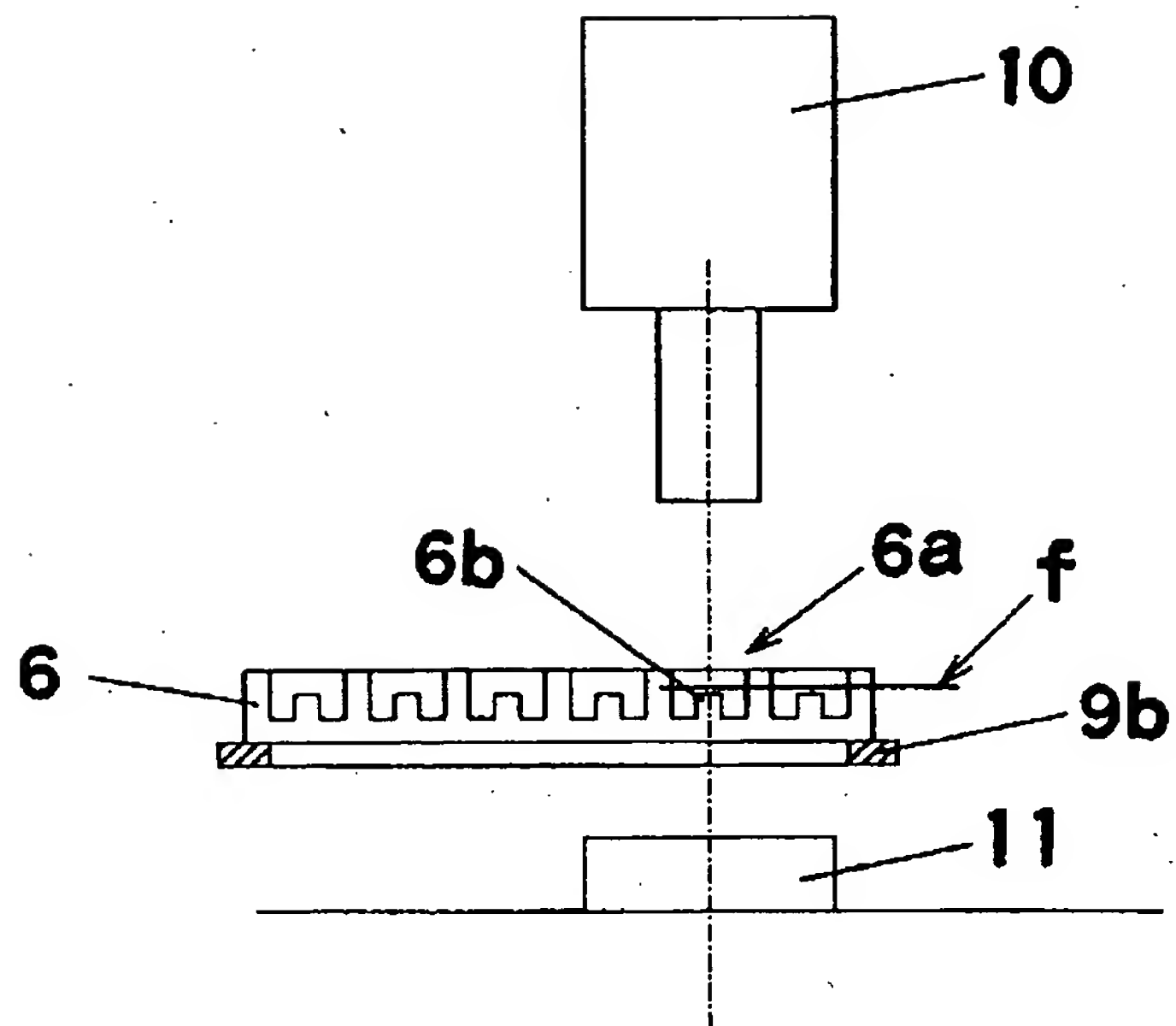
【圖 5】



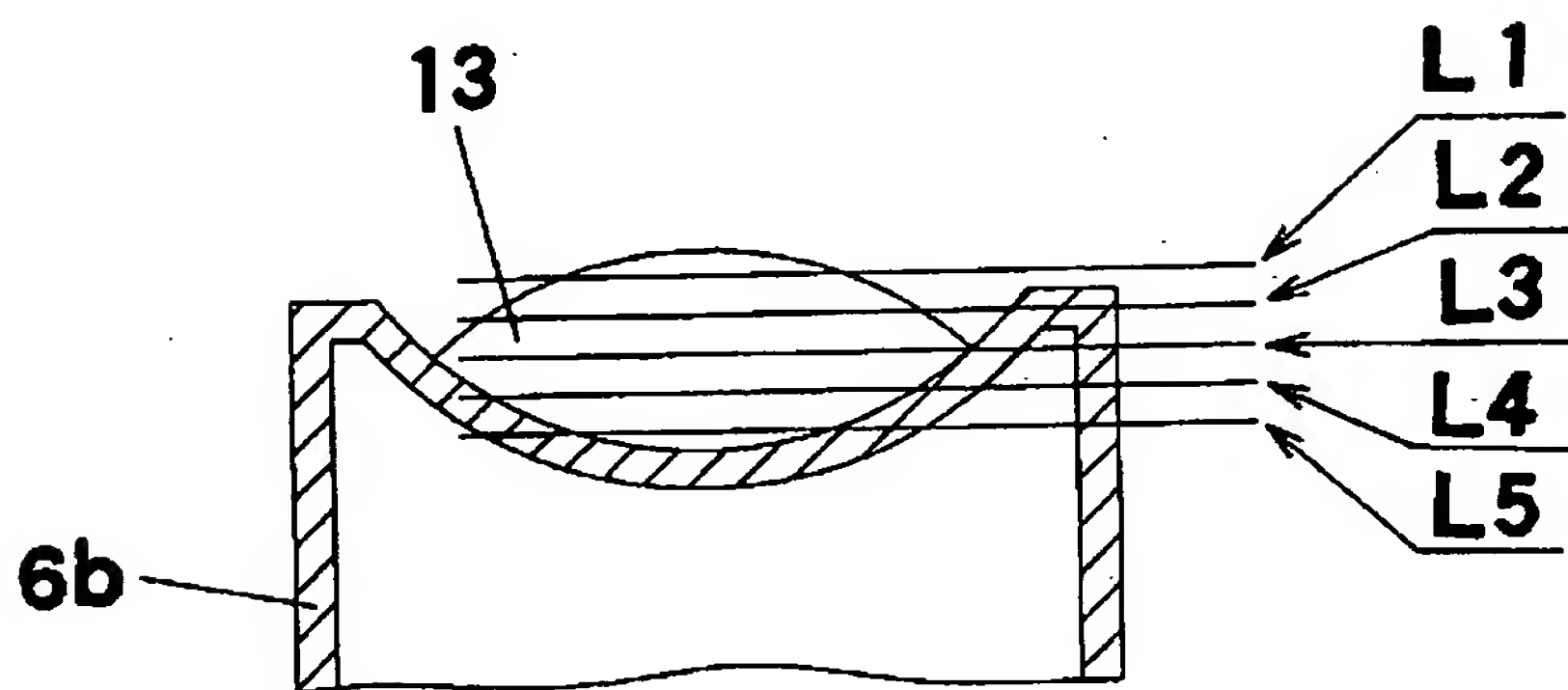
1 2 結晶化溶液  
1 3 蛋白質溶液



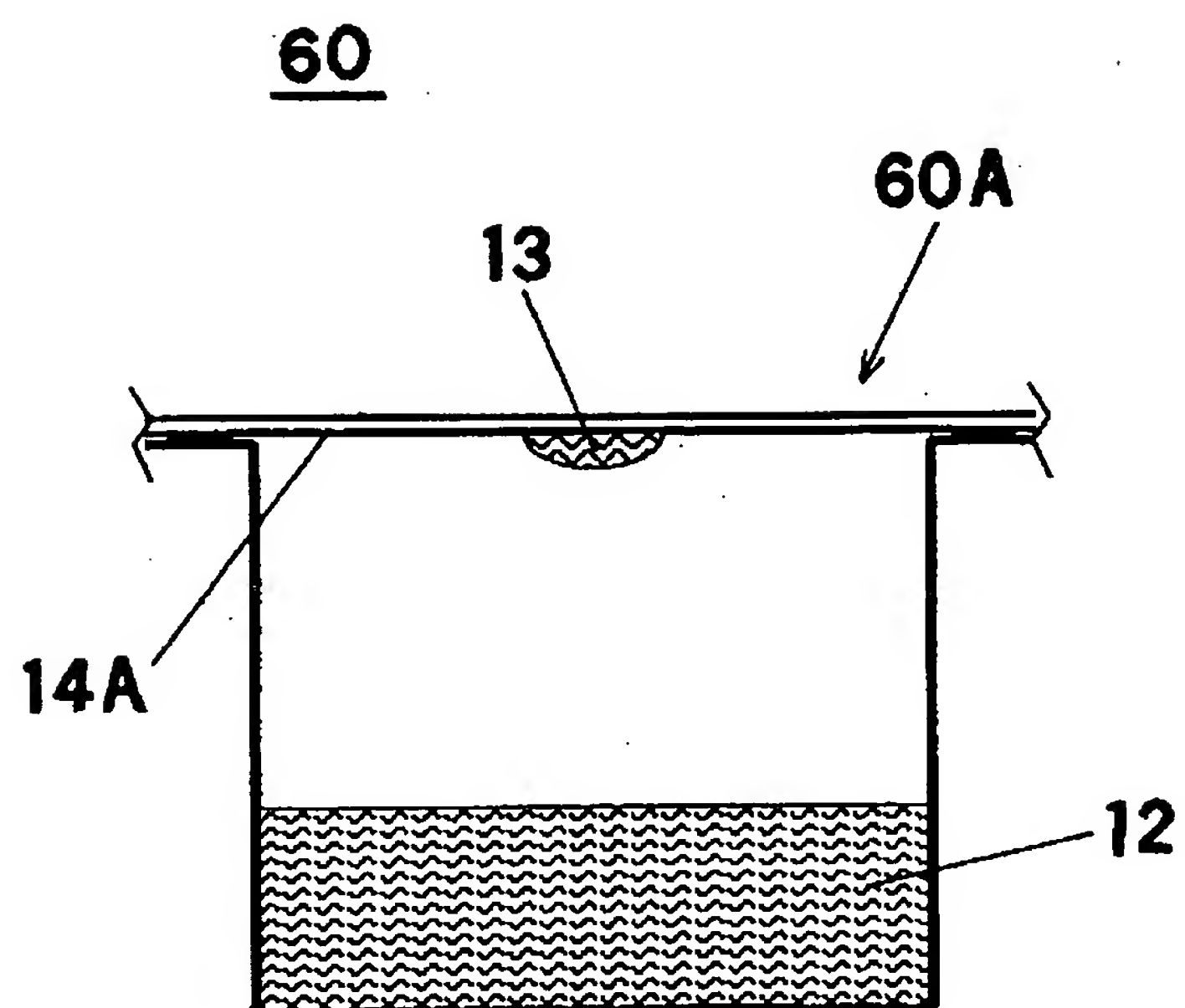
(a)



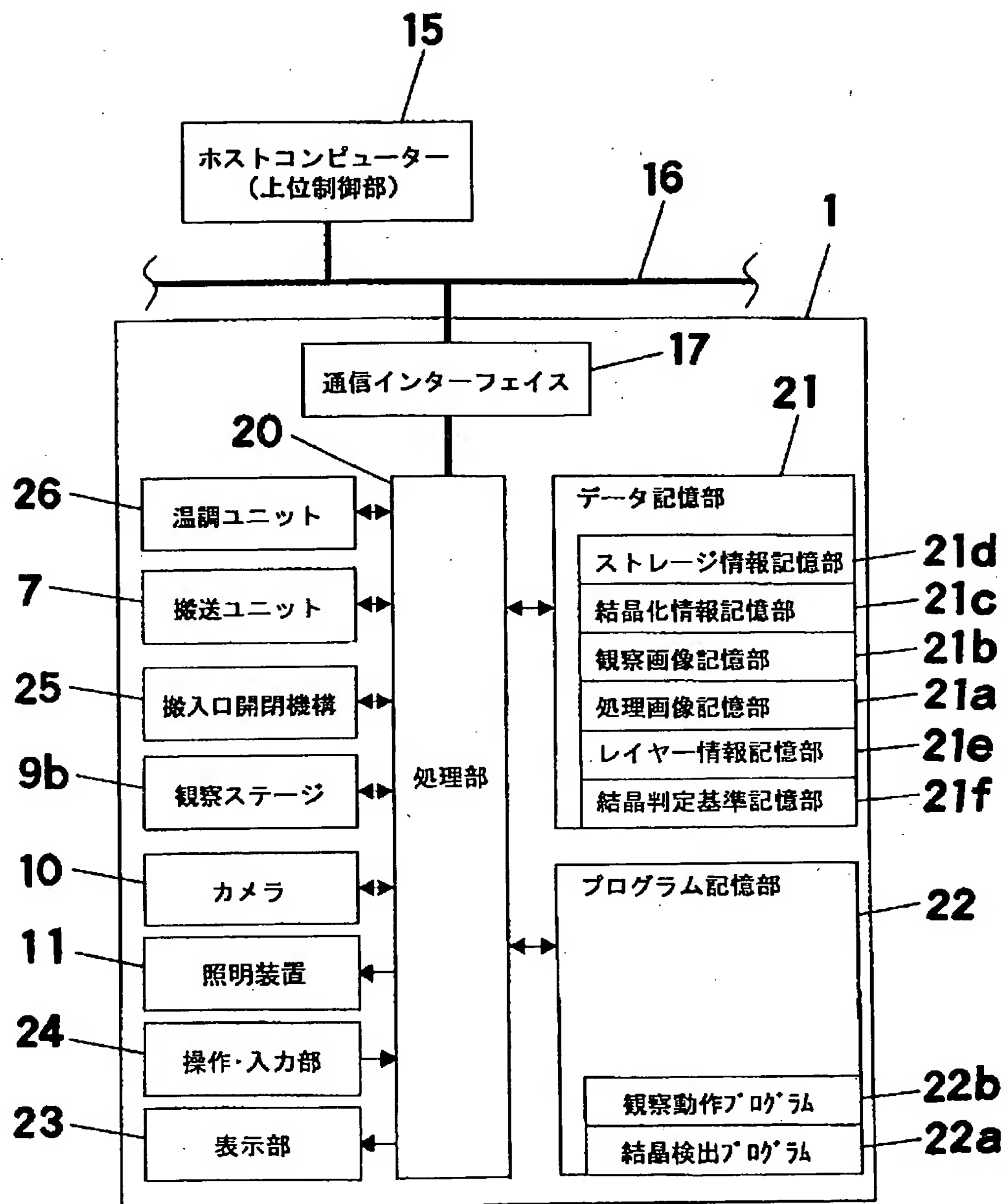
(b)



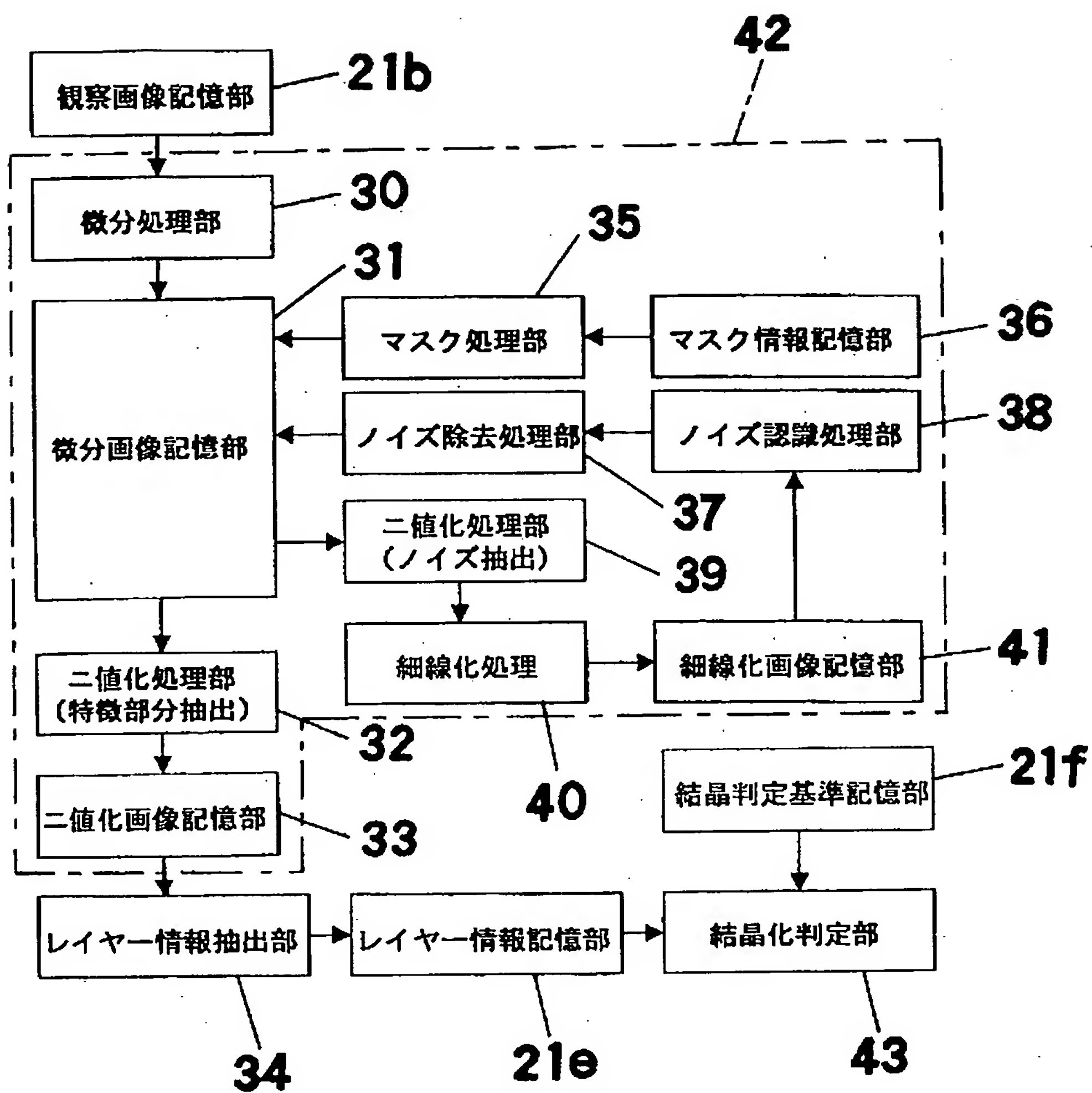
【図 7】



【図 8】

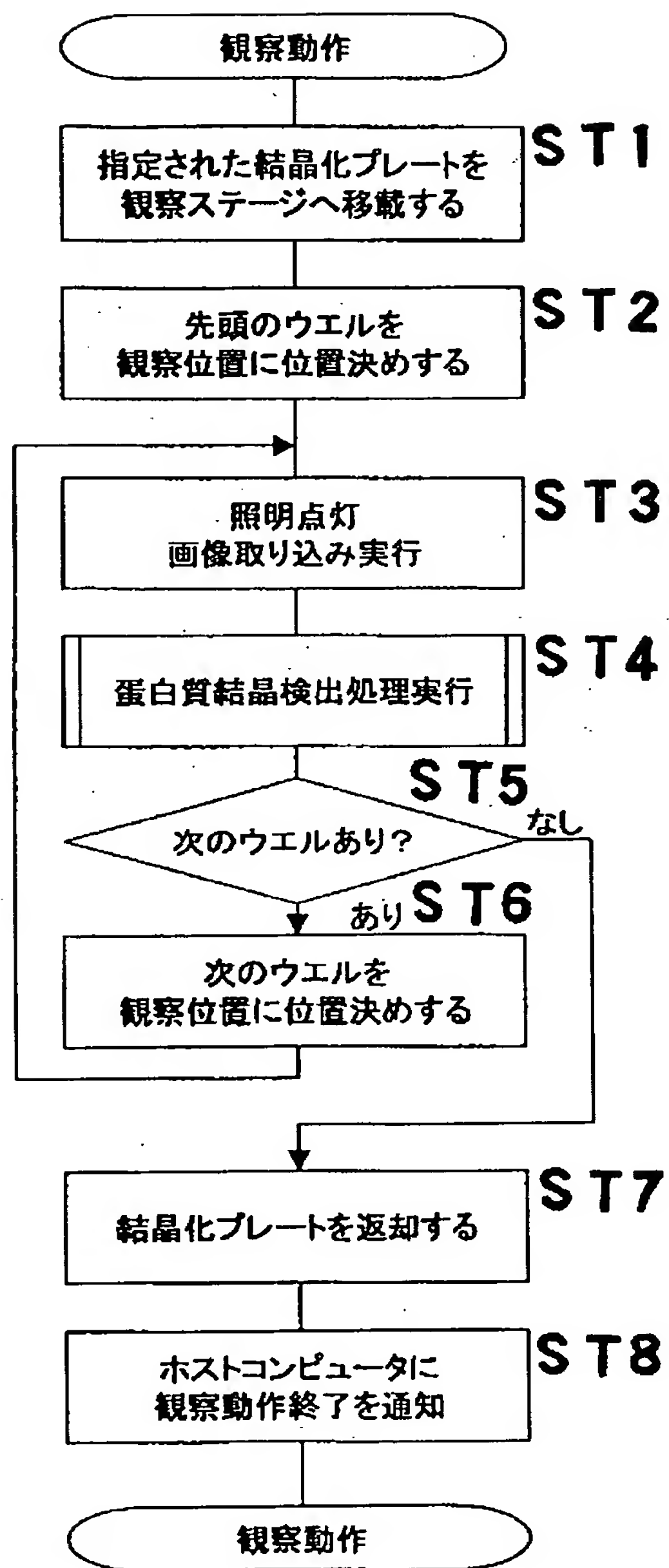


【図 9】

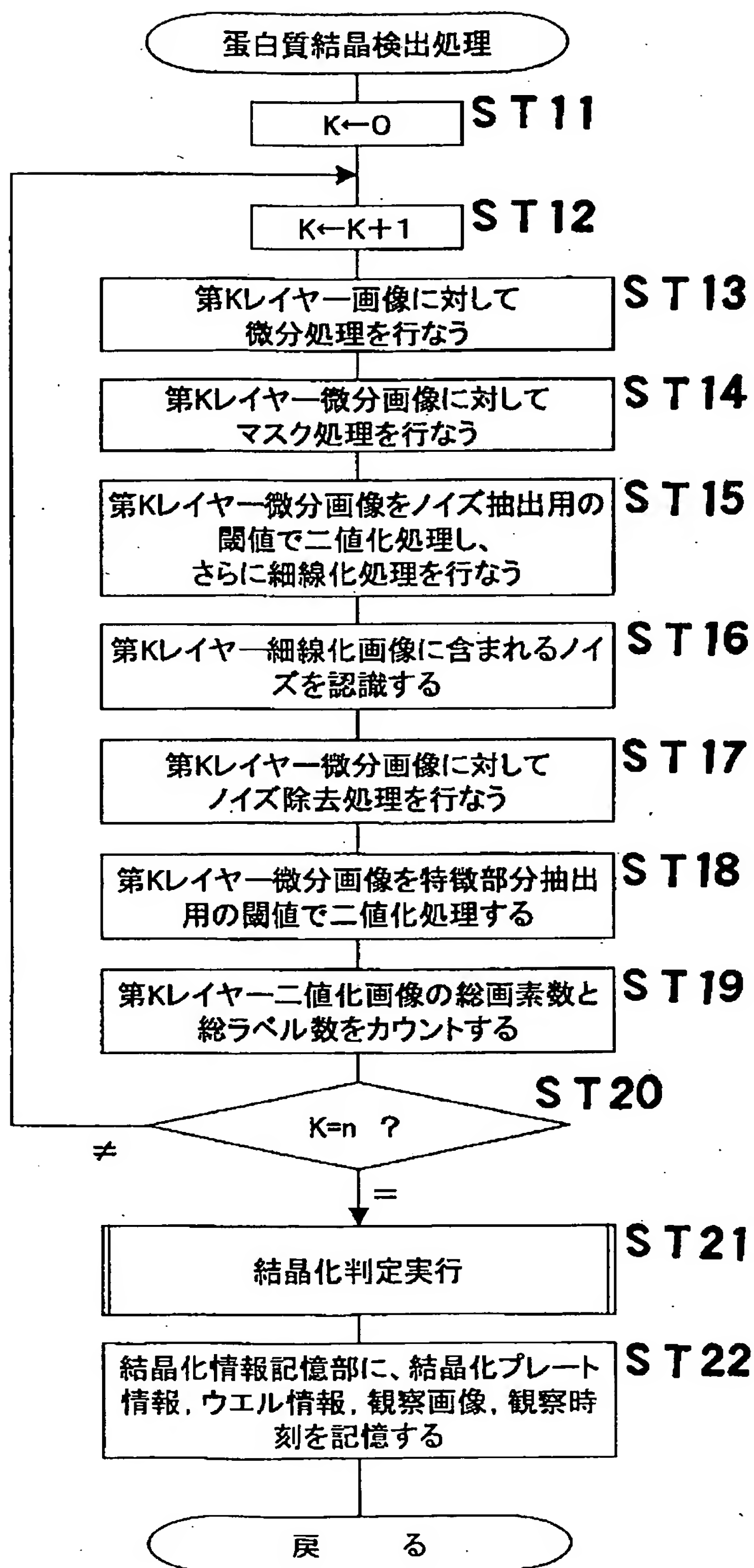




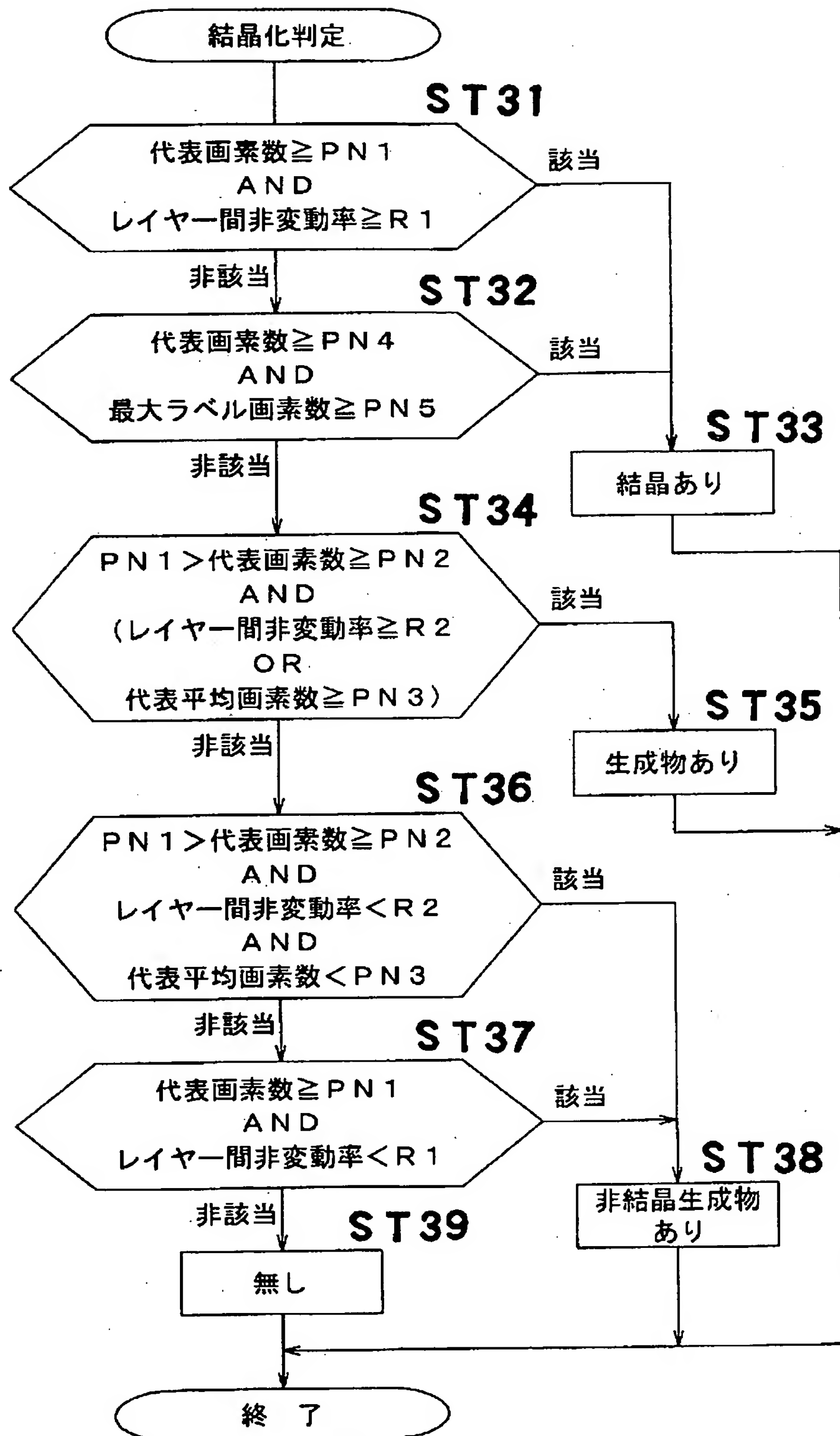
【図 10】

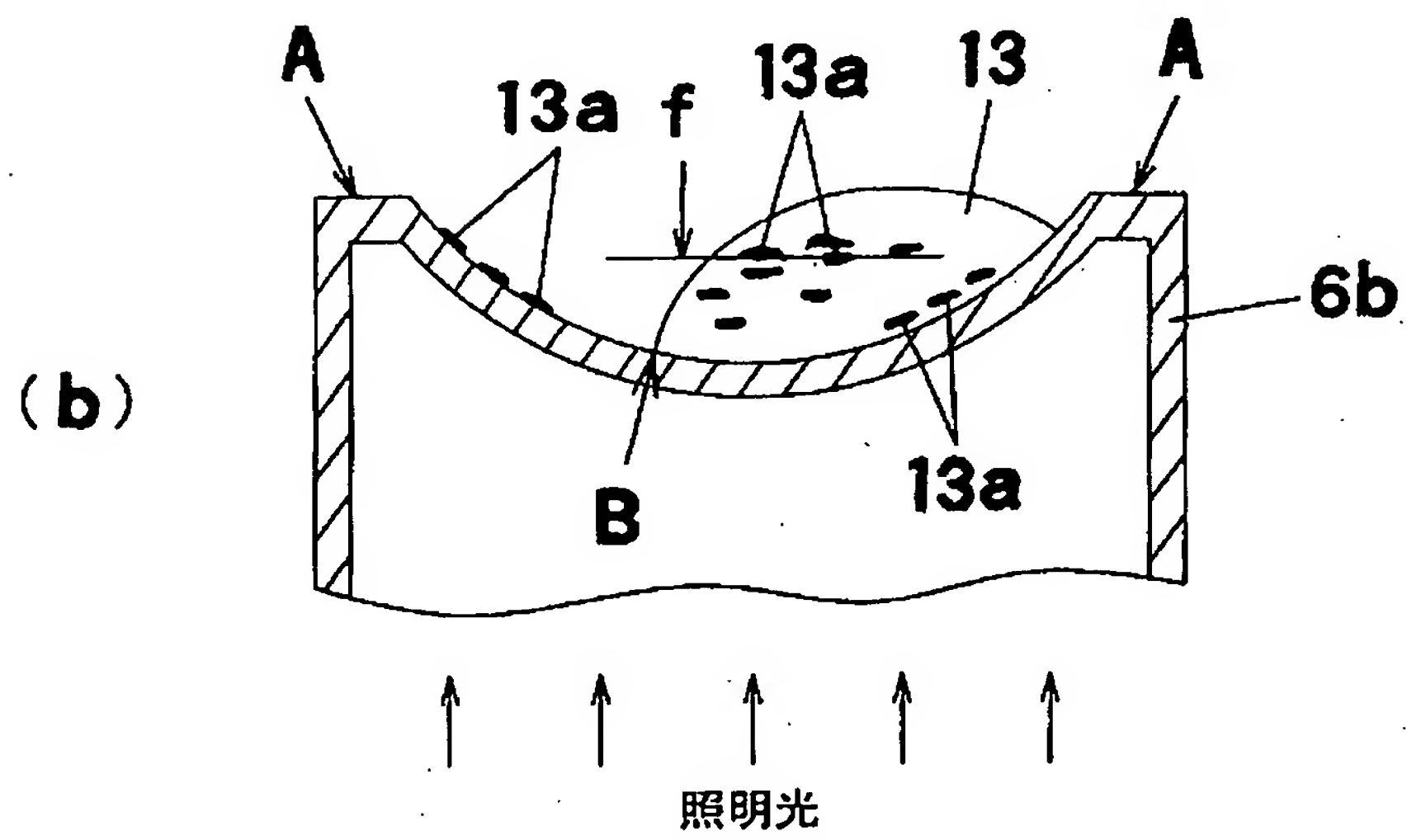
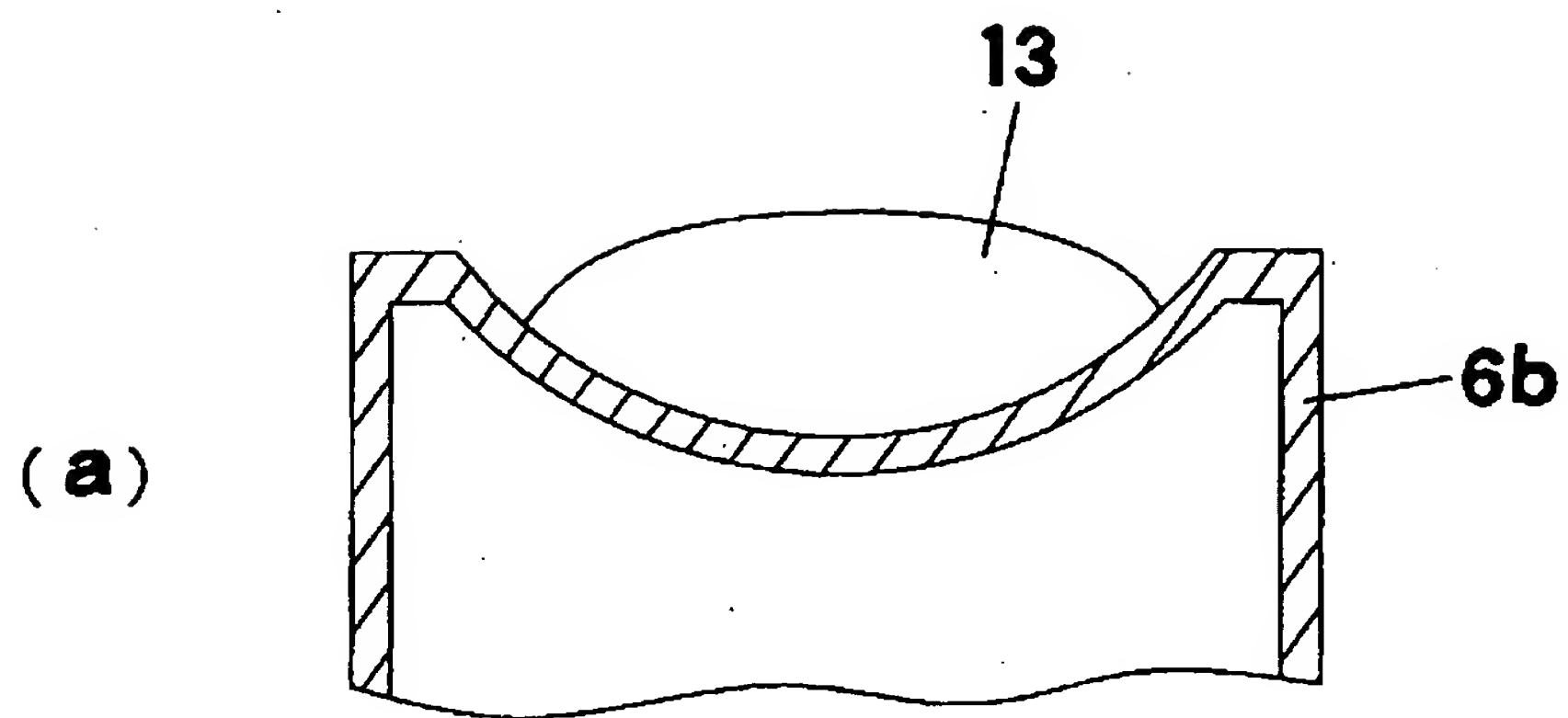


【図 1 1】



【図 1 2】

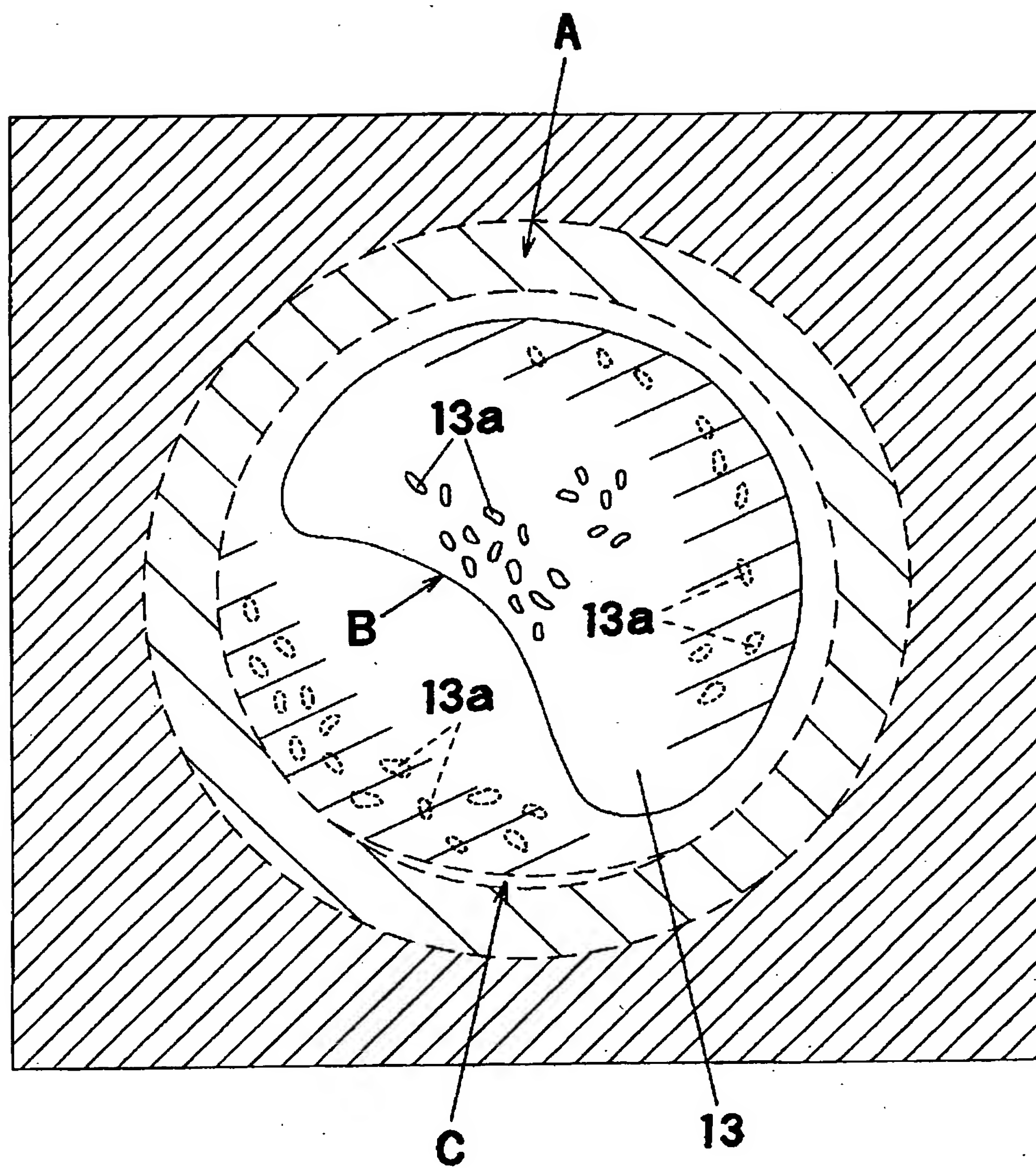


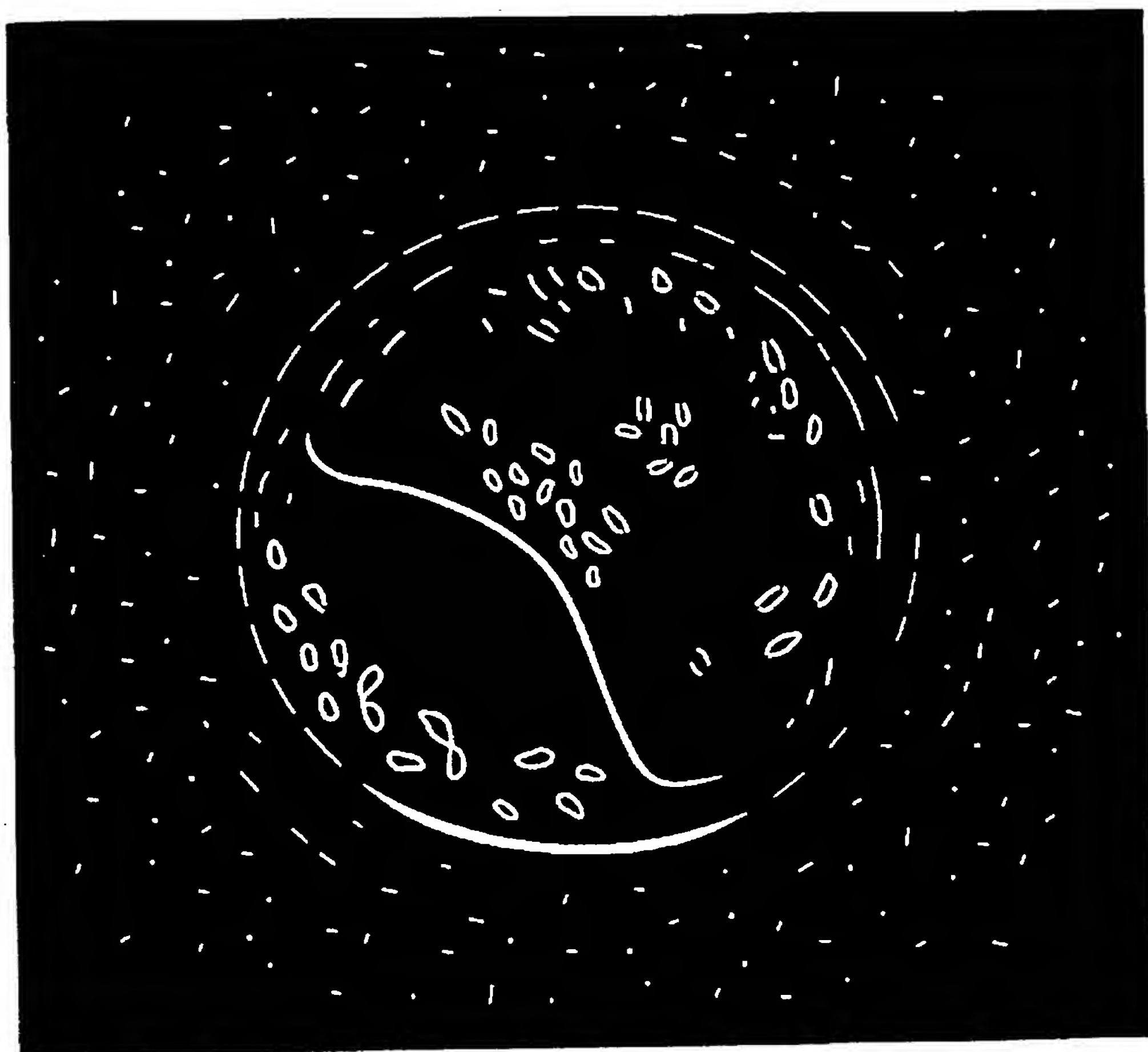


13a 蛋白質結晶

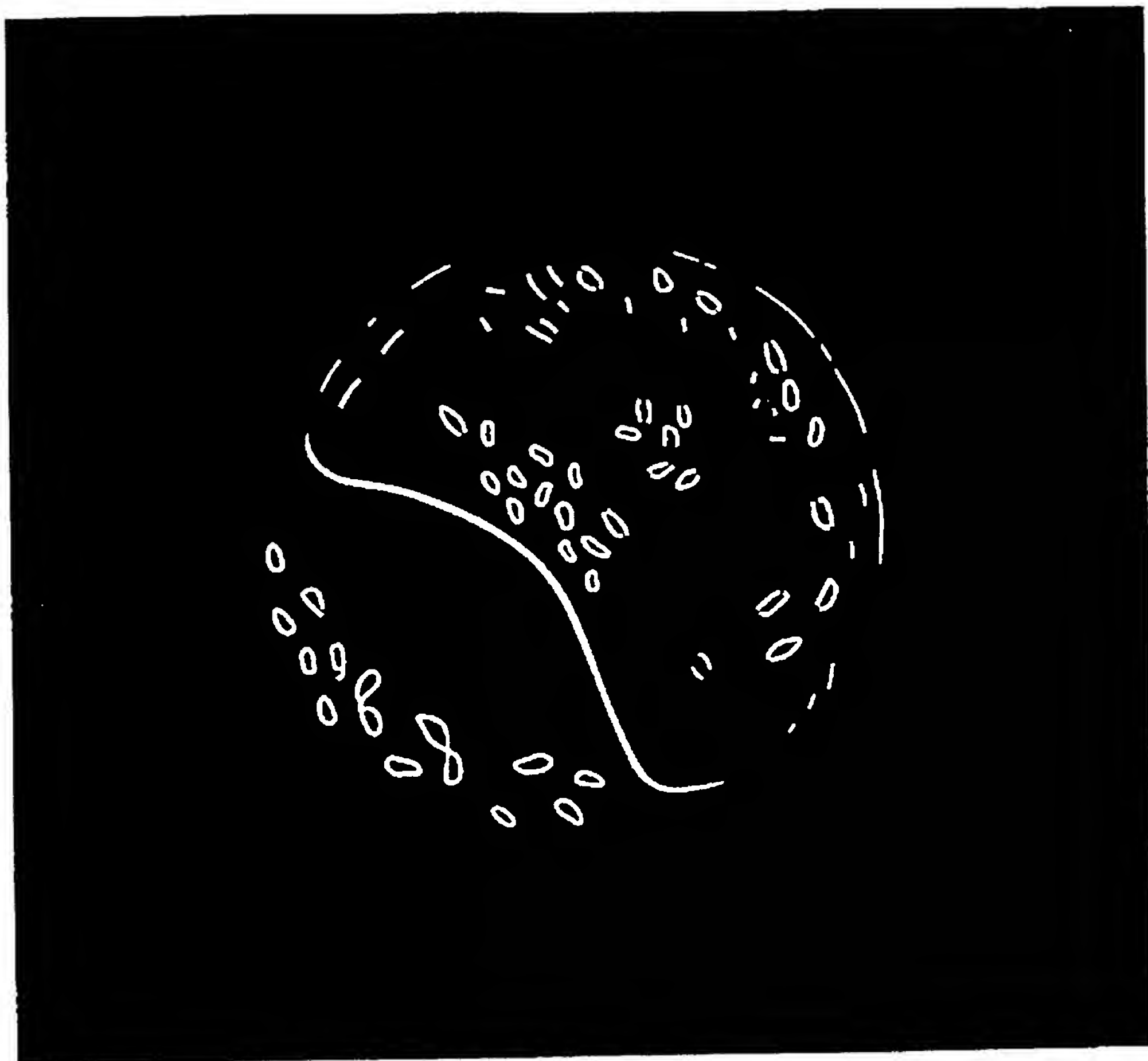


【図 14】

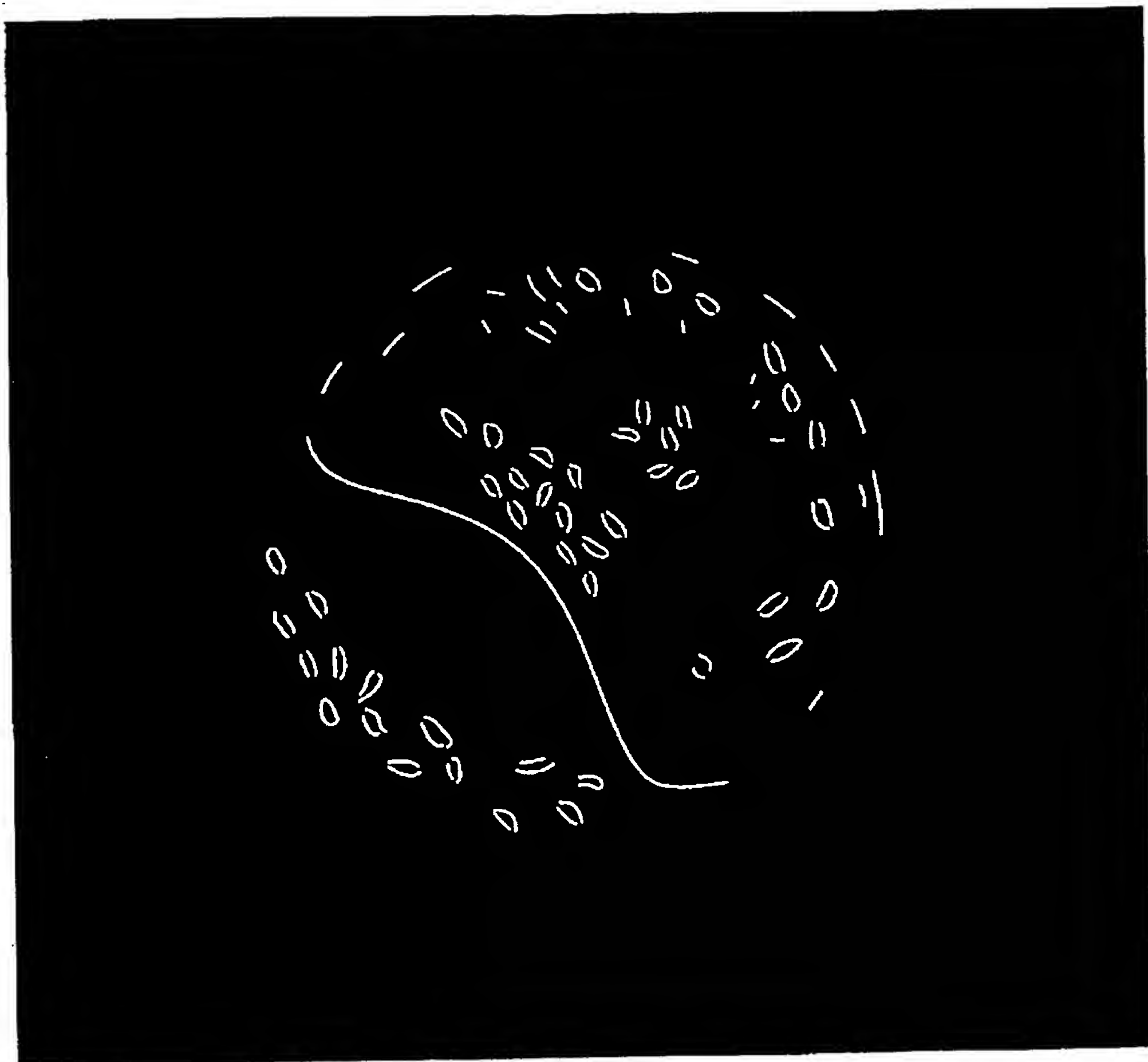




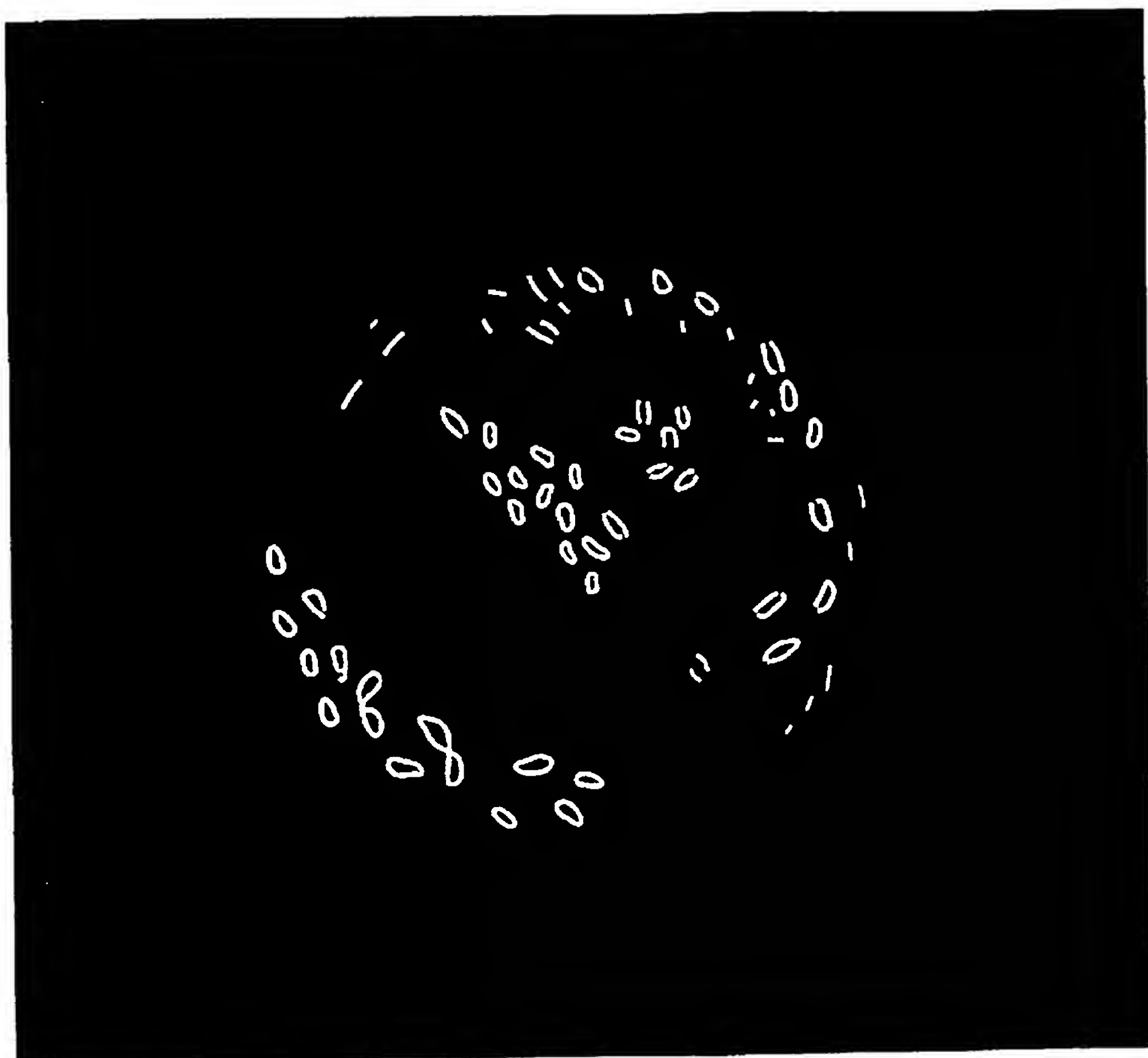
【图 16】

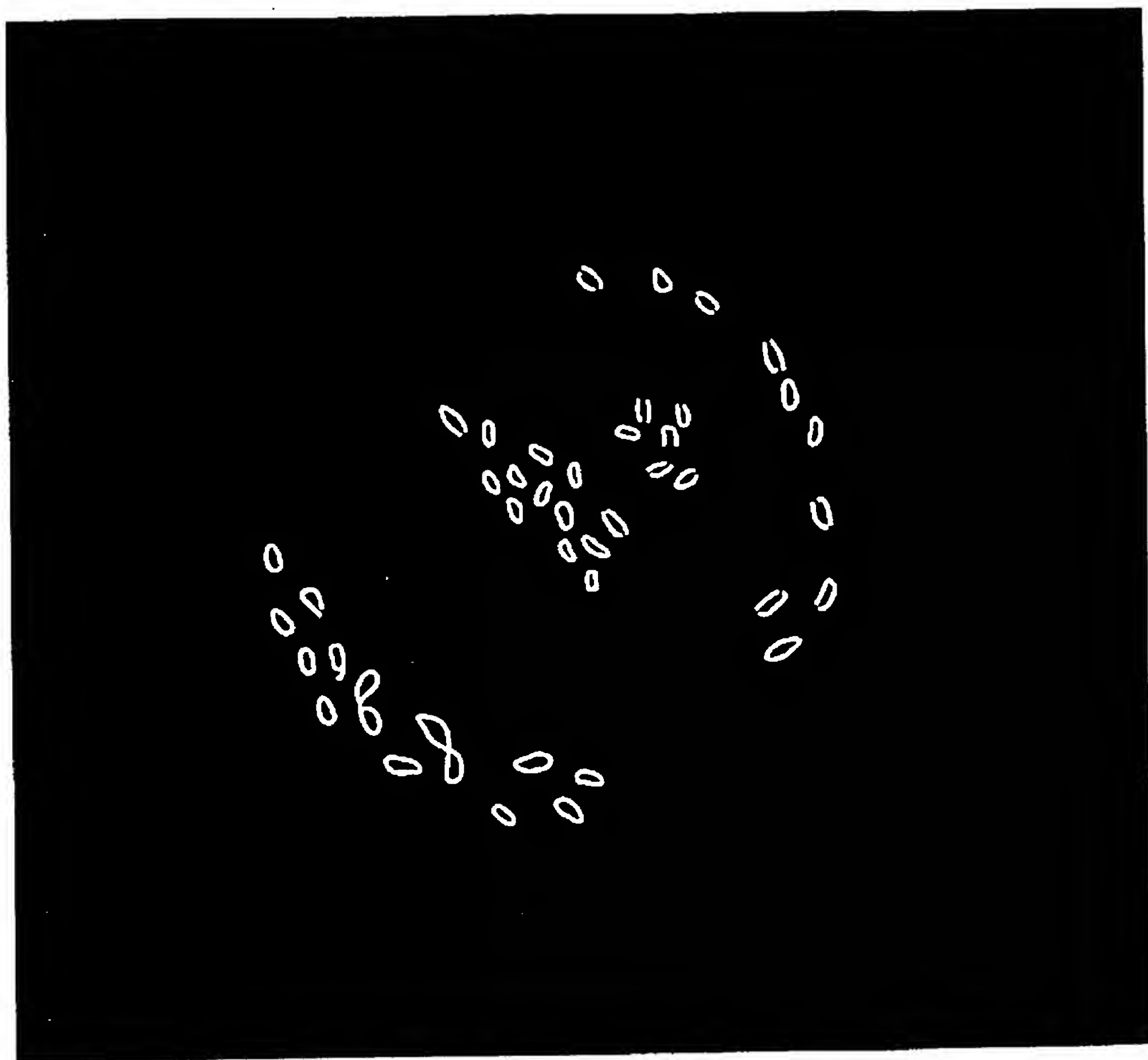


【图 1 7】

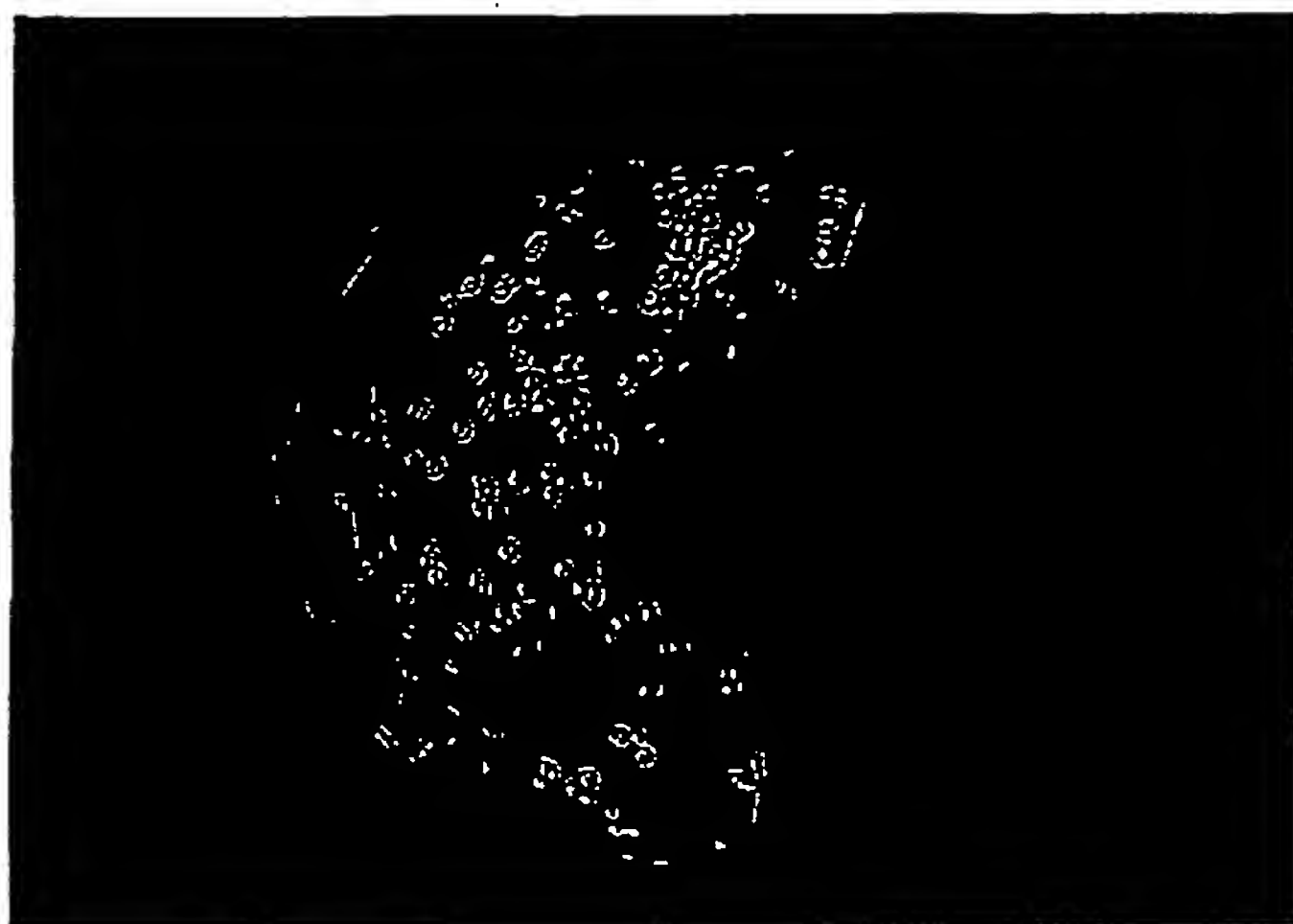




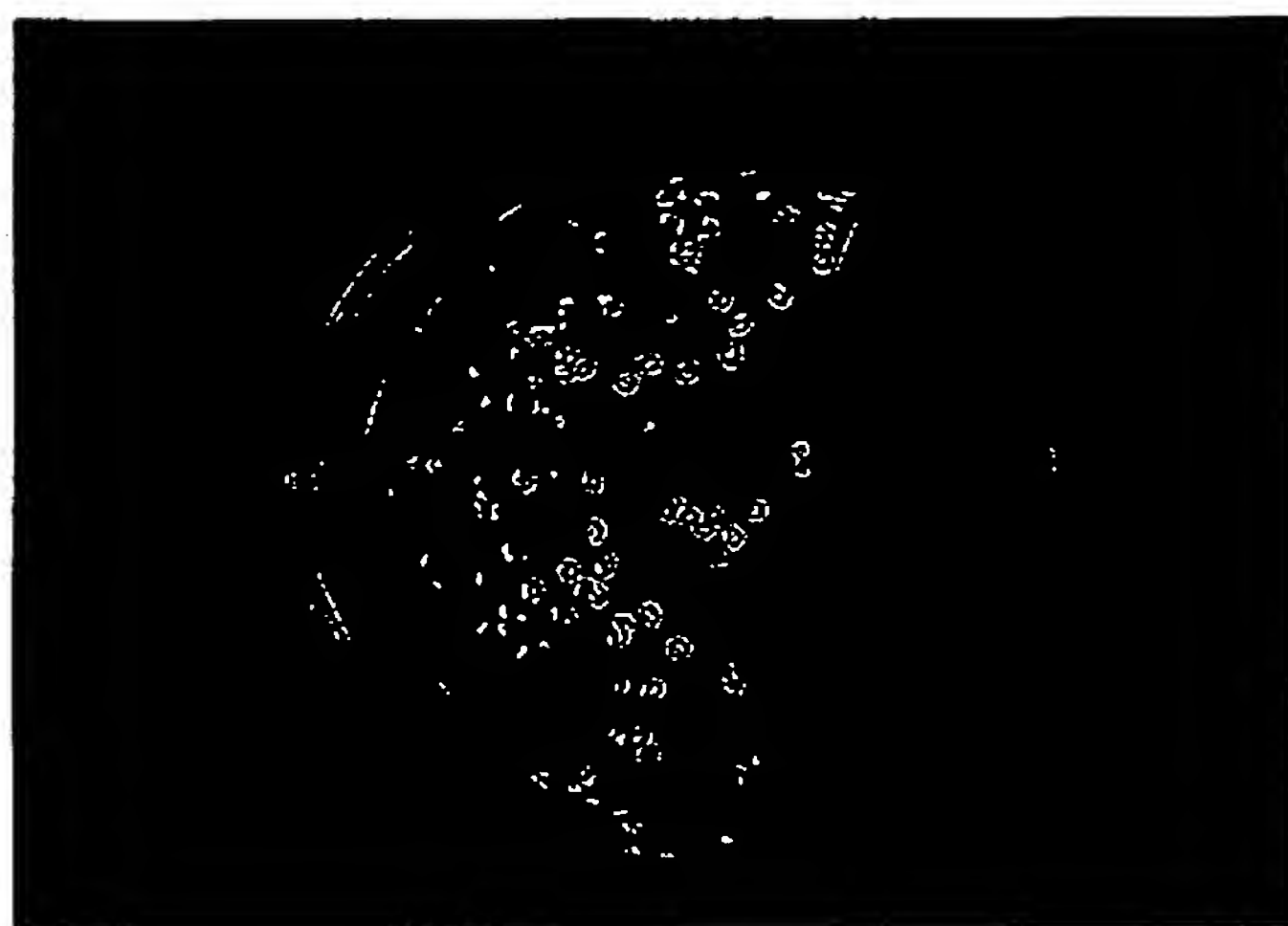




(a)

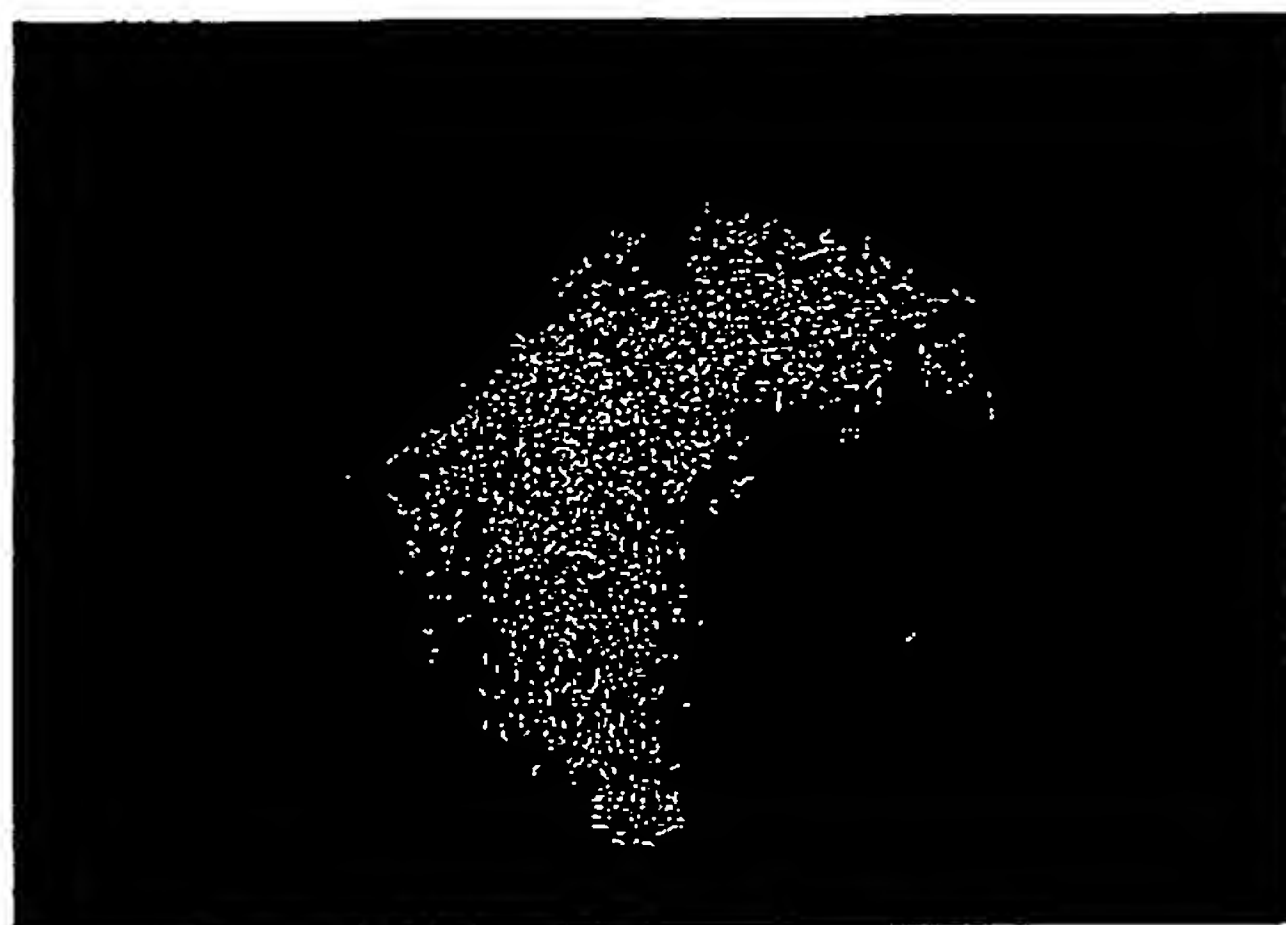


(b)



【图 2 1】

(a)



(b)





【書類名】要約書

【要約】

【課題】蛋白質結晶を高い精度で検出できる蛋白質結晶検出装置および蛋白質結晶検出方法を提供することを目的とする。

【解決手段】結晶化容器に保持された蛋白質溶液中の蛋白質結晶を検出する蛋白質結晶検出方法において、蛋白質溶液を複数の断面毎に撮像して得られた複数のレイヤー画像から蛋白質結晶の特徴部分を抽出した結晶特徴画像をレイヤー画像毎に生成し、特徴部分の画素数およびラベル数を数値化したレイヤー情報から、最も特徴部分が多いレイヤー画像の画素数を示す代表画素数、ラベル毎の代表平均画素数、隣接する2つのレイヤー間における特徴部分の画素数の比率を示すレイヤー間非変動率などの判定パラメータを演算する。結晶化判定では、これらの判定パラメータを判定しきい値と比較して、蛋白質結晶とその他生成物を厚みの違いで識別することにより、蛋白質結晶の生成状況を判定する。

【選択図】図12

出願人履歴

0 0 0 0 0 5 8 2 1

19900828

新規登録

大阪府門真市大字門真 1 0 0 6 番地

松下電器産業株式会社